

Homocystein als Risikofaktor bei Osteoporose?

Hypothesen

Fakten

Schlussfolgerungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Eva-Christina Honnes, geb. Otto

geboren am 18.10.1976 in Krefeld

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Gert E. Hein, FSU Jena**
- 2. Prof. Dr. Dr. Gunther O. Hofmann, FSU Jena**
- 3. Prof. Dr. med. K. Manger, Bamberg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.09.2010

Meiner geliebten Familie gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BMD	Bone mineral density
BHMT	Betain-Homocystein-Methyltransferase
CBS	Cystathionin- β -Synthase
CL	Crosslinks
CPIP	Carboxy (C)-terminales Propeptid
Cys	Cystathionin
DMG	Dimethylglycin
DPD	Desoxypyridinolin
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual X-ray Absorption
HC	Homocystein
Met	Methionin
MMA	Methylmalonsäure
MTBSFA	N-Methyl-N(tert-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamid
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reductase
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NPIP	Amino (N)-terminales Propeptid
PYD	Pyridinolin
SIM	single ion mode
Tab.	Tabelle
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1	Formen von Homocystein im Plasma 5
Abb. 2	Stoffwechselwege des Homocysteins und seiner Metabolite 10
Abb. 3	Chromatogramm von Homocystein 40
Abb. 4	Chromatogramm von Homocystein-D ₄ 40
Abb. 5	Chromatogramm von Cystathionin 41
Abb. 6	Chromatogramm von Cystathionin-D ₄ 41
Abb. 7	Chromatogramm von Dimethylglycin 42
Abb. 8	Chromatogramm von Dimethylglycin-D ₆ 42
Abb. 9	Chromatogramm von Methionin 43
Abb. 10	Chromatogramm von Methionin-D ₄ 43
Abb. 11	Geschlecht und Fraktur 44
Abb. 12	Altersverteilung 45
Abb. 13	Homocystein-Werte 47
Abb. 14	Homocystein (erhöht/nicht erhöht) und Fraktur 48
Abb. 15	Homocystein-Werte (µmol/l) bei Fraktur 49
Abb. 16	Fraktur bei Homocystein 49
Abb. 17	Cystathionin (nmol/l) bei Fraktur 50
Abb. 18	Dimethylglycin (µmol/l) bei Fraktur 51
Abb. 19	Methionin (µmol/l) bei Fraktur 52
Abb. 20	Crosslinks bei Fraktur 53
Abb. 21	Crosslinks und Homocystein 54
Abb. 22	Vitamin B12 (pmol/l) bei Homocystein 55
Abb. 23	Folsäure (nmol/l) bei Homocystein 56
Abb. 24	Ostase und Homocystein 57
Abb. 25	Kalzium und Homocystein 58

Tabellenverzeichnis	Seite
Tab. 1	Alter (Jahre) bei Homocystein 46
Tab. 2	Homocystein-Werte 46
Tab. 3	Fraktur bei Osteoporose 47

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	II
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1.1 Homocystein	4
2.1.2 Biochemische Aspekte	4
2.1.3 Pathophysiologische Aspekte	5
2.1.4 Hyperhomocysteinämie	8
2.2 Wichtige Metabolite im Homocystein-/Methioninstoffwechsel	9
2.2.1 Methionin	9
2.2.2 Cystathionin	9
2.2.3 Dimethylglycin	10
2.3 Klinische Bedeutung von Vitaminen im Homocysteinstoffwechsel	11
2.3.1 Folsäure	11
2.3.2 Vitamin B12	11
2.3.3 Vitamin B6	12
2.4 Homocysteinstoffwechsel und Pathomechanismus der Hyperhomocysteinämie	12
2.5 Enzyme im Homocystein-Stoffwechsel	12
2.5.1 Methionin-Synthase	12
2.5.2 Methylentetrahydrofolsäure-Reduktase	13
2.5.3 Cystathionin- β -Synthase	14
2.5.4 Cystathionin-Lyase	14
2.6 Osteoporose und Homocystein	15
2.6.1 Osteoporose	15
2.6.2 Osteodensitometrie	19
2.6.3 Pyridinolin und Desoxypyridinolin	21
2.6.4 Knochenstoffwechsel	22

2.6.5	Homocystein als Risikofaktor der Osteoporose	25
2.7	Einfluss einer Vitaminsubstitution auf die Konzentration von Homocystein	26
2.8	Bestimmungsmethoden des Homocysteins im Plasma	26
2.9	Referenzbereiche	27
3.	Zielstellung der Arbeit	28
4.	Material und Methoden	29
4.1	Material	29
4.1.1	Chemikalien und Lösungen	29
4.1.2	Geräte	29
4.2	Methoden	30
4.2.1	Probengewinnung	30
4.2.2	Probenvorbereitung	30
4.2.2.1	Probenvorbereitung zur Messung von Homocystein, Cystathionin, Dimethylglycin und Methionin	31
4.2.3	Messmethodik	32
4.2.3.1	Gaschromatographie-Massenspektrometrie	32
4.2.3.2	Konstante Isotopen-Verhältnisbestimmung	33
4.2.4	Messparameter	35
4.2.4.1	Messung von Homocystein, Dimethylglycin, Methionin und Cystathionin	35
4.3	Entwicklung und Evaluierung der Methodik	36
4.4	Anwendung der Messmethodik	37
4.4.1	Bestimmung an Osteoporose-Patienten	37
4.5	Statistische Verfahren	37
4.5.1	Präzision	37
4.5.2	Kolmogorov-Smirnov-Test	37
4.5.3	T-Test und Levene-Test	38
4.5.4	Mann-Whitney-U-Test	38
4.5.5	Chi-Quadrat-Test und exakter Test nach Fischer	38
4.5.6	Zweiseitige Signifikanzüberprüfung	38
4.5.7	Multivariate Analyse	38
4.5.8	Graphische Darstellungen	38

4.5.8.1 Fehlerbalken	39
4.5.8.2 Box-Plot	39
4.5.8.3 Balkendiagramme	39
5. Ergebnisse	40
5.1 Retentionszeiten	40
5.1.1 Homocystein	40
5.1.2 Cystathionin	41
5.1.3 Dimethylglycin	42
5.1.4 Methionin	43
5.2 Basisparameter	44
5.2.1 Geschlecht	44
5.2.2 Alter	45
5.2.2.1 Altersabhängigkeit bei Homocystein	46
5.2.3 Homocystein-Werte	46
5.2.4 Frakturen bei Osteoporose	47
5.3 Homocystein und Metabolite bei Fraktur	48
5.3.1 Homocystein bei Fraktur	48
5.3.2 Cystathionin bei Fraktur	50
5.3.3 Dimethylglycin bei Fraktur	51
5.3.4 Methionin bei Fraktur	52
5.4 Crosslinks	53
5.4.1 Pyridinolin und Desoxypyridinolin bei Fraktur	53
5.4.2 Crosslinks und Homocystein	54
5.5 Parameter der Labordiagnostik bei Osteoporose und Homocystein	55
5.5.1 Vitamin B12	55
5.5.2 Folsäure	55
5.5.3 Alkalische Phosphatase	56
5.5.4 Ostase	56
5.5.5 Serum-Kalzium	57
5.5.6 Serum-Phosphat	58

6. Diskussion	59
6.1 Hatten die Patienten, bei welchen eine erhöhte HC-Konzentration im Serum nachgewiesen werden konnte, anamnestisch im Krankheitsverlauf eine Niedrigenergiefraktur erlitten?	64
6.2 Welcher Zusammenhang besteht zwischen HC und den Vitaminen B12 und Folsäure?	65
6.3 Korrelieren die Messwerte der Metabolite Cystathionin, Dimethylglycin und Methionin mit der HC-Konzentration und welche Bedeutung ist dem zuzuschreiben?	65
6.4 Zeigten die Patienten, als Ausdruck eines gesteigerten Knochenabbaus, eine erhöhte Ausscheidung von Kollagen-Crosslinks im Urin und korrelieren diese Werte mit der Konzentration des HC im Serum?	66
6.5 Steigt die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten HC-Konzentration im Serum mit zunehmendem Lebensalter?	66
6.6 Gibt es geschlechtliche Unterschiede bei den Nachweisen eines erhöhten HC-Spiegels und dem Auftreten einer Fraktur?	66
7. Literaturverzeichnis	68
8. Anhang	76
8.1 Ärztefragebogen	76
8.2 Patientenfragebogen	79
9. Lebenslauf	83
10. Danksagung	84
11. Ehrenwörtliche Erklärung	85

1. Zusammenfassung

Eine erhöhte HC-Konzentration im Serum gilt als Risikofaktor der Osteoporose und ist in zahlreichen Studien untersucht und beschrieben worden.

In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob eine erhöhte HC-Konzentration im Serum einen Einfluss auf das Auftreten einer Fraktur bei Osteoporose-Patienten haben könnte.

Die in Kapitel **3. Zielstellung der Arbeit** aufgelisteten Fragen können zusammengefasst folgendermaßen beantwortet werden.

1. Hatten die Patienten, bei welchen eine erhöhte HC-Konzentration im Serum nachgewiesen werden konnte, anamnestisch im Krankheitsverlauf eine Niedrigenergiefraktur erlitten?

Aufgrund der Ergebnisse der Arbeit kann festgehalten werden, dass das Risiko des Auftretens einer Fraktur bei erhöhtem HC-Spiegel signifikant erhöht ist.

2. Welcher Zusammenhang besteht zwischen HC und den Vitaminen B12 und Folsäure?

Es zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen HC und den Vitaminen B12 und Folsäure, wobei die Folsäure im Vergleich zum Vitamin B12 eine hohe Signifikanz zeigt, was die allgemeine Meinung unterstützt, dass die Folsäure den stärksten Einfluss auf den HC-Spiegel hat.

3. Korrelieren die Messwerte der Metaboliten Cystathionin, Dimethylglycin und Methionin mit der HC-Konzentration und welche Bedeutung ist dem zuzuschreiben?

Eine hohe Korrelation konnte zumindest für Cys und HC und für Met und HC nicht nachgewiesen werden, was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass bei keinem der Probanden ein Vitaminmangel-Zustand bestand. Für DMG und HC konnte eine grenzwertige Signifikanz ermittelt werden.

4. Zeigten die Osteoporose-Patienten, als Ausdruck eines gesteigerten Knochenabbaus, eine erhöhte Ausscheidung von Kollagen-Crosslinks im Urin und korrelieren diese Werte mit der Konzentration des HC im Serum?

Ein signifikanter Zusammenhang konnte in der multivarianten Analyse zwischen einer erhöhten Ausscheidung von Kollagen-Crosslinks im Urin und der HC-Konzentration im Serum dargestellt werden.

5. Steigt die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten HC-Konzentration im Serum mit zunehmendem Lebensalter?

Es ist aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit anzunehmen, dass die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten HC-Konzentration mit steigendem Lebensalter zunimmt.

6. Gibt es geschlechtliche Unterschiede bei den Nachweisen eines erhöhten Homocystein-Spiegels und einer Fraktur?

Geschlechtliche Unterschiede konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

In der univariaten Analyse konnte mit dem exakten Test nach Fisher mit 0,069 für Patienten mit einem erhöhten HC-Spiegel ein deutlicher Trend dargestellt werden, so dass sich hier ein bedeutsames Indiz für das Risiko ergibt, eine Fraktur zu erleiden, und dass HC somit eine Einflussgröße auf das Frakturrisiko darstellt.

In der multivariaten Analyse konnte sogar mit einem Wert von 0,026 ein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden.

Um diese Zusammenhänge weiter verfolgen zu können, wäre es aber notwendig, eine prospektive Studie mit größeren Fallzahlen durchzuführen.

Weiterhin bestand mit 0,021 (multivariate Analyse) ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CL-Ausscheidung im Urin und einer erhöhten HC-Konzentration im Serum. So kann angenommen werden, dass HC sehrwahrscheinlich einen Einfluss auf den Knochenabbau beziehungsweise auf die Osteoklastenaktivität hat.

Ein gegenläufiger signifikanter Zusammenhang konnte auch für das HC und die Vitamine B12 und Folsäure gezeigt werden, das heißt, bei erhöhtem HC finden sich niedrigere Werte des Vitamin B12 und der Folsäure und bei nicht erhöhtem HC normale bzw. erhöhte Werte. Der negative Zusammenhang war zu erwarten, da diese Vitamine bei hinreichender Versorgung als Cofaktoren bei der Remethylierung von HC zu Met fungieren und bei niedrigen Spiegeln eher erhöhte HC-Werte resultieren.

Zwischen erhöhtem HC im Serum und dem Kalzium-Spiegel als möglichen Marker gesteigerter Osteoklastentätigkeit besteht keine Korrelation.

Für die Parameter wie Ostase, Phosphat und alkalische Phosphatase und erhöhter HC-Konzentration und dem Auftreten einer Fraktur konnten keine Zusammenhänge aufgezeigt werden.

Abschließend muss nochmals betont werden, dass es nicht zwingend der erhöhte HC-Spiegel sein muss, welcher zu einer gesteigerten Tätigkeit der Osteoklasten und somit zu erhöhtem Knochenabbau führen kann. Eine geringere Knochendichte oder verminderte Matrixqualität der Knochenproteine könnte auch durch niedrige Vitamin B-Spiegel beziehungsweise „B-Vitamin-Resistenz“ bedingt sein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit bedeutsame Anhaltspunkte dafür bieten, dass eine erhöhte HC-Konzentration im Serum mit einem gesteigerten Frakturrisiko einhergeht. Ob das HC ursächlich für die Frakturen sein kann oder auf andere Ursachen einer Osteoporose einwirkt, kann jedoch bei dieser Art der Studie nicht geklärt werden, weswegen zu diesen Fragestellungen die Durchführung von Interventionsstudien gefordert werden muss.

2. Einleitung

2.1 Homocystein

2.1.1 Biochemische Aspekte

Chemisch gesehen gehört Homocystein (HC) zur Gruppe der Aminosäuren. HC ist ein schwefelhaltiges Intermediärprodukt im komplexen Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Methionin. Durch Reaktion mit Adenosintriphosphat (ATP) entsteht aus Methionin S-Adenosylmethionin, das als Methyl donor einer Reihe von Biosynthesen dient [88]. Nach Adenosinabspaltung entsteht das als schädlich eingestufte Zwischenprodukt HC. Es wird bei Gesunden bei ausreichender Versorgung mit Vitamin B12 in einer von diesem Vitamin abhängigen Reaktion mit Methyl-Tetrahydrofolat (Tetrahydrofolsäure = wirksame Form der Folsäure) zu Methionin remethyliert. Brönstrup et al. konnten zudem in einer Studie mit Probanden mit normalem Folatstatus und Homocysteinplasmaspiegeln im Normbereich belegen, dass durch die kombinierte Gabe von Folsäure und Vitamin B12 eine maximale Senkung des Homocysteins im Plasma erreicht werden konnte [12].

Diese Verknüpfung zwischen Vitamin B12 und Folsäure ist die einzig bekannte Verknüpfung zweier Vitamine im Stoffwechsel. Beim Abbau von HC verliert dieses seine Sulfhydrylgruppe durch Transsulfurierung. Da eine Direktübertragung nicht möglich ist, kondensiert die Sulfhydrylgruppe des HC mit der Hydroxylgruppe von Serin und es entsteht Cystathionin. Diese Reaktion ist Pyridoxalphosphat - abhängig (Pyridoxalphosphat = Derivat von Vitamin B6). Durch Spaltung des Cystathionins entstehen Cystein und Homoserin, welche zu Pyruvat bzw. α -Ketobutyrat weiter abgebaut und dem Stoffwechsel zugeführt werden. HC bildet einen Verzweigungspunkt im Stoffwechsel der schwefelhaltigen Aminosäuren.

Verschiedene Formen des HC im Plasma (Homocystein ist ein Sammelbegriff für verschiedene chemische Spezies, welche alle aus dem freien Homocystein abgeleitet sind):

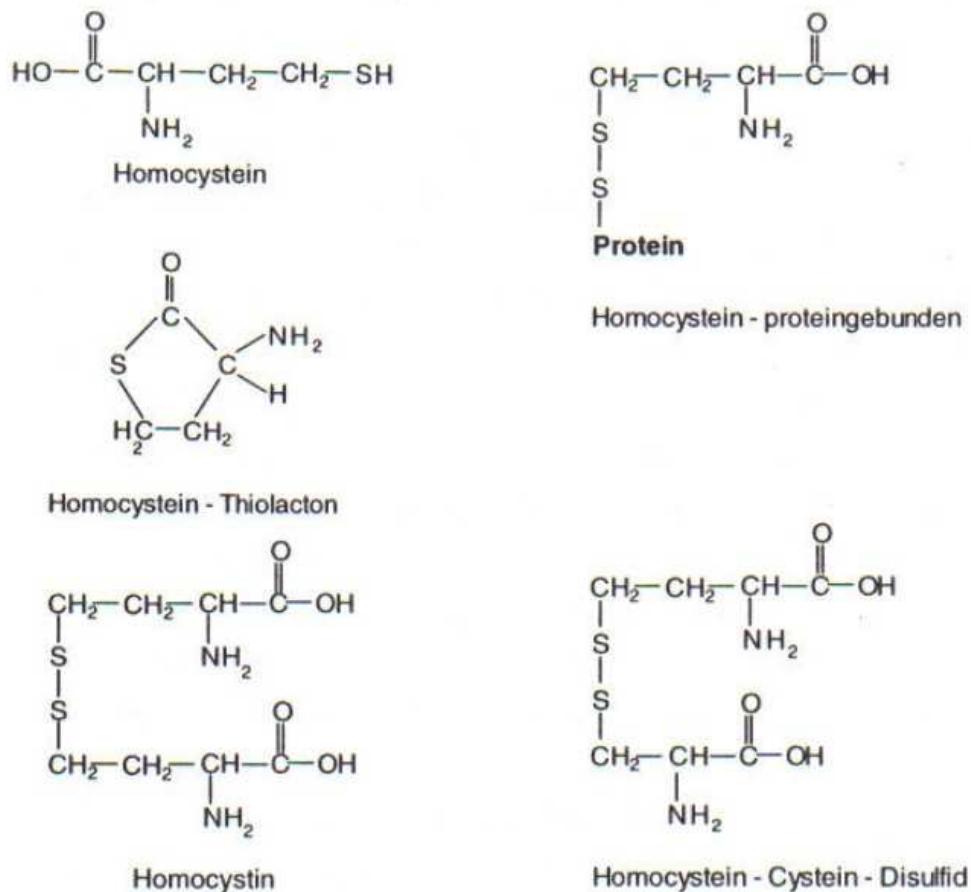


Abbildung 1: Formen von Homocystein im Plasma

2.1.2 Pathophysiologische Aspekte

Eine Homocysteinämie ist am häufigsten auf erworbene Ursachen zurückzuführen. In erster Linie spielen hier Mangelzustände der Vitamine B6, Folsäure und B12 sowie altersabhängig physiologische Einschränkungen der Eliminationsfähigkeit der Niere eine Rolle [78, 19]. Ebenso wie diese Vitamin-Mangelzustände können Enzymdefekte zur Zunahme des HC in Geweben und Körperflüssigkeiten führen; den sehr selten vorkommenden, schwersten Formen der Hyperhomocysteinämie liegen meist homozygote Enzymdefekte basierend auf familiär auftretenden Gendefekten zugrunde [74]. Am häufigsten besteht ein Defekt der CBS, aber auch Störungen der Cystathionin-Lyase, der 5-, 10- Methylentetrahydrofolatreduktase

(MTHFR), der HC-Methyltransferase und der Betain-HC-Methyltransferase wurden beschrieben [69, 94]. Eine schwere Arteriosklerose und sowohl arterielle als auch venöse Gefäßverschlüsse traten dabei bereits im Kindesalter auf und die Erkrankung führte ohne Behandlung meist früh zum Tod. Therapeutisch wird versucht, durch hohe Vitamin B6-Gaben den Abbau von HC zu Cystein und Cystin zu fördern [69].

In jüngerer Zeit wurde ein Schlüsselenzym des Methionin-Homocystein-Stoffwechsels, die MTHFR molekulargenetisch analysiert. Eine besondere Rolle spielt der MTHFR-Polymorphismus C677T. Der Austausch von Cytosin durch Thymin führt zu einem Ersatz der Aminosäure Alanin durch Valin. Dieser Aminosäureaustausch bewirkt eine Thermolabilität der MTHFR, so dass bei Körpertemperatur eine Aktivitätsabnahme dieses Enzyms um etwa 70% resultiert [48]. Da bei ausreichender Versorgung mit Folsäure jedoch HC trotzdem remethyliert werden kann, ist diese Aktivitätsminderung von keiner großen Bedeutung. Ist der Folsäure-Spiegel allerdings niedrig, kann es bei homozygoten Merkmalsträgern zu einem Anstieg der HC-Konzentration um etwa 25% ($2 - 3 \mu\text{mol/l}$) kommen [50, 87, 98].

Am häufigsten besteht eine Defekt der Cystathionin- β -Synthase (CBS), durch den Defekt der CBS ist die Umwandlung von HC zu Cystathionin gestört; sehr viel seltener ist ein Defekt der Remethylierung von HC zu Methionin. Metabolische Folgen des Enzymdefektes sind eine intrazelluläre Akkumulation von HC, eine Zunahme der Konzentration von HC im Serum und ihre verstärkte Ausscheidung mit dem Urin. Im Blutserum sind etwa 70 – 80% des HC über eine Disulfidbindung an Proteine gebunden, vor allem an Albumin. Das freie HC kann über SH-Gruppen mit anderen SH-Verbindungen Disulfide bilden. Die Zunahme von Methionin im Serum und Gewebe beruht sowohl auf einem Anstau infolge der gestörten Stoffwechselreaktion, als auch auf einer verstärkten Remethylierung des HC.

Das im Plasma vorliegende HC hat keine physiologische Funktion, sondern stellt einen Risikofaktor bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen dar.

Zum Beispiel zerstört HC die Endothelschicht der Arterien, wodurch Gerinnungsprozesse ausgelöst werden.

HC ist im Plasma an der Modifikation von LDL beteiligt [84]. Aggregate aus HC und LDL werden von Makrophagen phagozytiert [59]. Dies führt zur Bildung von Schaumzellen und zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, welche die Arteriosklerose fördern [60].

Wenn es zur intrazellulären Anreicherung von HC kommt, resultiert ein Zelluntergang. Weiterhin wird die Aktivierung des Gerinnungssystems und die der Thrombozyten induziert

[59, 84]. Zudem wird durch den Untergang von Endothelzellen die Protein-C-Aktivierung beendet und damit die Inaktivierung der (aktivierten) Faktoren Va und VIIIa gestört [39].

Ferner fördern erhöhte HC-Konzentrationen im Plasma die Proliferation von glatten Muskelzellen und führen zu einer Verdickung der Intima [93].

HC regt eine vermehrte Bildung von Kollagenfasern an und führt zu einer Vergrößerung der glatten Muskelzellen [99] sowie zu einer Rückbildung der elastischen Fasern, wodurch die betroffenen Gefäße ihre Elastizität verlieren. Zudem kommt es zu einer erhöhten Ablösung von Endothelzellen an den Gefäßinnenwänden und Inhibition des Endothelwachstums [91]. Die Regulation der Durchblutung verschlechtert sich und leistet der Gerinnungsbildung Vorschub.

Im Gehirn zum Beispiel wirkt HC neurotoxisch. Im Tierversuch konnten Guéant et al. zeigen, dass ein erhöhter HC-Spiegel in bestimmten Hirnarealen mit dem programmierten Zelltod, der Apoptose, einhergeht [38] und in der Folge kognitive und motorische Störungen auftreten. Bei der Alzheimer Krankheit ist der Mangel an Vitamin B bekannt.

Eine Studie bei Patienten, welche an Multiple Sklerose erkrankt waren, zeigte sich, dass der Homocystein-Spiegel mit dem Grad der aufgetretenen Depressionen korreliert. Jedoch konnte kein Zusammenhang zu den Vitamin B12- und Folsäure-Spiegeln und dem Behinderungsgrad hergestellt werden, so dass man auf einen bisher nicht bekannten Faktor für ein erhöhtes Homocystein schließen könnte [90].

Bei schwangeren Patientinnen korreliert eine erhöhte Homocystein-Konzentration mit einem erhöhtem Risiko, eine Fehlgeburt zu erleiden, sowie der Entwicklung einer Eklampsie [67]. Ein erhöhter Homocysteinwert im mütterlichen Blut stellt ebenso ein Risikofaktor für die Entstehung von Neuralrohrdefekten bei Kind dar [33]. Kinder, welche anamnestisch einen Schlaganfall erlitten hatten, wiesen signifikant häufiger als gesunde Kinder, Störungen im Homocysteinstoffwechsel auf [97].

Desweiteren ist ein erhöhter HC-Spiegel ein Risikofaktor für die Entstehung der Makuladegeneration [47, 79]. Die Gabe eines Vitamin-B-Komplexes, bestehend aus Vitamin B12, Vitamin B6 und Folsäure, senkt den HC-Spiegel und mindert signifikant die Wahrscheinlichkeit, eine Makuladegeneration zu entwickeln [21].

2.1.3 Hyperhomocysteinämie

Grundsätzlich ist der HC-Spiegel altersabhängig und steigt mit dem Alter an. Statistisch gesehen haben im Alter von etwa 50 Jahren 50% aller Erwachsenen einen erhöhten HC-Spiegel und in ca. 90% eine Unterversorgung an Folsäure. Ein Folsäuremangel ist dabei der häufigste Vitaminmangel in Europa. Ernährungswissenschaftler empfehlen die tägliche Aufnahme von 400 µg Folat, verzehrt werden allerdings nur etwa 300 µg pro Tag, so dass bei einem nicht unerheblichen Teil der Bevölkerung von einer Fehlversorgung auszugehen ist, was erhöhte HC-Spiegel zur Folge hat. Bei älteren Menschen wird deswegen eine HC-Bestimmung nach erfolgter Vitaminsubstitution als sinnvoll angesehen.

HC-Konzentrationen im Serum bis zu 10 µmol/l werden als normal betrachtet. Bereits eine HC-Konzentration bis 15 µmol/l bedeutet eine deutliche Risikosteigerung für schädliche Auswirkungen [58, 81, 71].

Bei männlichen Probanden konnten höhere HC-Spiegel festgestellt werden als bei weiblichen. Der Unterschied betrug etwa 21%. Dies wird zum einen auf einen senkenden Effekt des Östrogens zurückgeführt, zum anderen auf die größere Muskelmasse bei Männern. Nach der Menopause lassen sich erhöhte HC-Spiegel finden.

Im oxidativen Potential des freien HC besteht ein bedeutender pathogenetischer Faktor, da SH-Gruppen als essentiell für pathologische Auswirkungen der Hyperhomocysteinämie angesehen werden [55].

Eine weitere, bereits in 1.1.2 beschriebene Ursache der Hyperhomocysteinämie ist neben dem Folsäuremangel der ernährungsbedingte Mangel von Vitamin B12 und Vitamin B6, da hier die Methioninsynthese durch Remethylierung nachhaltig gestört ist. Diese Vitaminmängel stellen etwa 2/3 der Ursachen für eine Hyperhomocysteinämie.

Die häufigste hereditäre Ursache stellt der homozygote Mangel an N⁵, N¹⁰-Methylen tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) mit einer Prävalenz von 0,4 – 1,5 % dar. Es steht keine effektive Therapie zur Verfügung; Symptome sind neurologische Defizite, psychomotorische Retardierung, periphere Neuropathie, Thrombembolien und eine früh auftretende Arteriosklerose.

Eine weitere hereditäre Ursache für eine ausgeprägte Hyperhomocysteinämie mit Konzentrationen > 100 µmol/l ist die Defizienz der Cystathionin-β-Synthase. Die homozygote Form weist eine Prävalenz von 1 : 335.000 auf. Homocystein erreicht hierbei Plasmakonzentrationen bei Nahrungskarenz von bis zu 400 µmol/l. Zu den klinischen Symptomen zählen Skelettdeformitäten, geistige Retardierung, Thrombembolien und eine früh auftretende Arteriosklerose.

Zu weiteren Ursachen einer Hyperhomocysteinämie zählt zum Beispiel insbesondere die Niereninsuffizienz, wobei Konzentrationen erreicht werden, die das Vierfache des oberen Referenzbereiches ausmachen. Nach der Dialyse fallen die HC-Konzentrationen häufig wieder ab.

Medikamente, die mit den Stoffwechseln von Vitamin B12, Folsäure und Vitamin B6 interferieren, können eine mäßige Hyperhomocysteinämie verursachen. Hierzu gehören Methotrexat, Antikonvulsiva und Theophyllin. Im Gegenzug vermindern Östrogene, Tamoxifen, Penicillamin und Acetylcystein die HC-Konzentration.

2.2 Wichtige Metabolite im Homocystein-/Methionin-Stoffwechsel

2.2.1 Methionin

Methionin (Met) ist in seiner natürlichen L-Form eine essentielle proteinogene Aminosäure. Neben Cystein ist Methionin die einzige schwefelhaltige Aminosäure. Met stellt im Stoffwechsel ein Lieferant für Methylgruppen ($-\text{CH}_3$) dar. Nach Abgabe der Methylgruppe entsteht S-Adenosylmethionin, das, nachdem der Adenosyl-Rest hydrolytisch gespalten wurde, durch die Enzyme Cystathionin-Synthetase und Cystathionase mit Serin zu Homoserin und Cystein umgesetzt werden kann.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, Methionin aus Homocystein wieder zurückzugewinnen. Hierbei wird die oben genannte Reaktionsfolge umgekehrt durchlaufen und dann in einem Vitamin B12-abhängigen Schritt eine Methylgruppe, zum Beispiel von Tetrahydrofolsäure oder Betain, auf das S-Adenosylhomocystein übertragen, welches dadurch wieder zu S-Adenosylmethionin umgesetzt wird, aus dem wiederum Methionin freigesetzt werden kann.

2.2.2 Cystathionin

Cystathionin (Cys) entsteht aus HC in einer Vitamin B6-abhängigen Reaktion (Enzym: Cystathionin- β -Synthase) durch Kondensation der Sulfhydrylgruppe des HC mit der Hydroxylgruppe von Serin. Anschließend wird Cys in einer ebenfalls Vitamin B6-abhängigen Reaktion (Enzym: Cystathionlyase) in Cystein und Homoserin gespalten. Homoserin wird weiter zu α -Ketobutyrat desaminiert. Beim Cystein stammt das Schwefelatom von Homocystein und das Kohlenstoffgerüst vom Serin. Ohne Bereitstellung des Serins ist daher letztlich der Abbau von Methionin nicht möglich. Ebenso ist es verständlich, dass ein Defekt eines der beiden Enzyme zu einer Störung des Abbaus und somit zu einer Erhöhung des Homocysteins führen muss.

2.3 Klinische Bedeutung von Vitaminen im Homocysteinestoffwechsel

Wie bereits erwähnt, spielen die Vitamine Folsäure, B12 und B6 eine große Rolle im Stoffwechsel von Homocystein. Selhub et al., die Untersuchungen an 1160 Mitgliedern der Framingham-Population durchführten, machten für zwei Drittel der gefundenen Hyperhomocysteinämiefälle einen Mangel an einem oder mehreren dieser Vitamine verantwortlich [80].

2.3.1 Folsäure

Die Folsäure ist für die Remethylierung des HC zu Met als Methylgruppendonator notwendig. Auf die Homocystein-Konzentration im Blut hat sie unter den drei Vitaminen den stärksten Einfluss. Dabei scheinen die bisher als normal angesehenen Serumkonzentrationen bzw. die von der World Health Organization (WHO) empfohlene tägliche Einnahmemenge von 200 µg nicht auszureichen, um den HC-Spiegel im Normbereich zu halten. In einer Analyse aus 27 Studien ermittelten Boushey et al. einen Tagesbedarf von 400 µg Folsäure [8].

Hinsichtlich der Bedeutung der Folsäure für die Hyperhomocysteinämie sind folgende zwei Aspekte wichtig:

Erstens ist ein Mangel an Folsäure in der Bevölkerung mit etwa 50% weit verbreitet, was dazu geführt hat, dass in Amerika Lebensmittel mit Folat angereichert werden, weil ein Folsäure-Mangel zudem auch Neuralrohrdefekte beim Neugeborenen verursachen kann [45]. Zweitens gibt die Folsäure bei Vorliegen der thermolabilen Variante der MTHFR den Ausschlag, ob der Gendefekt phänotypisch manifest wird. MTHFR-Homozygote, deren Folsäure-Spiegel hoch ist, können trotz einer um etwa 70% verminderten Enzymaktivität normale HC-Werte aufweisen. Hierfür ist allerdings eine im Vergleich zur Normalpopulation höhere Folatzufuhr nötig.

2.3.2 Vitamin B12

Vitamin B12 dient ebenfalls bei der Remethylierung als Cofaktor. Die Abhängigkeit der HC-Konzentration im Blut vom Vitamin B12-Spiegel ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der Folsäure [82, 9, 96].

Hauptursache eines B12-Mangels ist die atrophische Gastritis. Diese chronische Entzündung verursacht eine langsame Zerstörung der Magenschleimhaut und ihrer Zellen. So werden auch die Belegzellen geschädigt, welche unter normalen Umständen den Intrinsic factor bilden. Der Intrinsic factor ist für die Resorption des Vitamin B12 im terminalen Ileum notwendig.

Besteht nun ein Mangel an Intrinsic factor, kann das mit der Nahrung zugeführte Vitamin B12 aus dem Dünndarm nicht resorbiert werden. Die Aufnahme des Vitamin B12 ist somit an eine intakte Magenschleimhaut gebunden.

2.3.3 Vitamin B6

Vitamin B6 ist Cofaktor bei der Transsulfurierung, durch die Homocystein zu Cystein abgebaut wird. Selhub et al. fanden bei der Nüchtern-Hyperhomocysteinämie einen starken Einfluss von Vitamin B6 [82]. Hierbei könnte es epidemiologisch wichtig sein, dass Nikotin ein Vitamin B6-Antagonist ist [61] und das Rauchen deswegen zu erhöhten HC-Werten beitragen könnte.

2.4 Homocysteinestoffwechsel und Pathomechanismen der Hyperhomocysteinämie

Der HC-Abbau erfolgt über zwei Wege, welche auf die verschiedenen Vitamine B12, Folsäure und B6 als Coenzyme angewiesen sind, die Remethylierung und die Transsulfurierung. Als Regulator dieser beiden Wege fungiert S-Adenosylmethionin, weil es zum einen die Aktivität der CBS stimuliert und zum anderen die Aktivität der MTHFR hemmt.

Das HC kann also entweder durch Remethylierung zu Methionin regeneriert werden oder weiter abgebaut werden. Der weitere Abbau geschieht in einer zweistufigen Reaktion und ist abhängig von Pyridoxalphosphat, einem Derivat des Vitamin B6. Die Regeneration zu Methionin kann über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege, dem Betainweg und dem Tetrahydrofolatstoffwechsel, erfolgen. Der Betainweg wird vorrangig in der Leber bestritten, während in den meisten anderen Geweben die Remethylierung über den Tetrahydrofolatstoffwechsel erfolgt, in dem die MTHFR eine zentrale Rolle spielt.

2.5 Enzyme im Homocystein-Stoffwechsel

2.5.1 Methionin-Synthase

Die Reaktion der N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat-Homocystein-S-Methyltransferase = Methionin-Synthase dient der Regeneration des Methylgruppenüberträgers S-Adenosylmethionin

beziehungsweise der Bildung von Methionin. Dabei wird HC zum Met remethyliert. Gelingt dies nicht, bildet sich vermehrt HC.

Als Methylgruppendonator fungiert dabei N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat. Besteht ein Mangel an Coenzym Vitamin B12, reichert sich N⁵-Methyl-Tetrahydrofolat an und infolge dessen entsteht ein sekundärer Mangel an Tetrahydrofolsäure, welche für die Synthese der Purinbasen Adenin und Guanin und der Pyrimidinbase Thymidin erforderlich ist. Durch einen Mangel an diesen Nukleobasen ist die Synthese insbesondere von DNA aber auch RNA gestört.

2.5.2 Methylentetrahydrofolsäure-Reduktase

Die MTHFR spielt in den meisten Geweben eine zentrale Rolle bei der Remethylierung von HC zu Met. Sie benötigt Vitamin B12 und Folsäure als Cofaktoren. Das Enzym wird zur Umwandlung von 5, 10-Methylentetrahydrofolsäure zu 5-Methyltetrahydrofolsäure benötigt. Die entstehende 5-Methyltetrahydrofolsäure dient als Methylgruppendonator und wird so als Coenzym der Methionin-Synthase eingesetzt.

Es lassen sich leichte und schwere Formen des genetisch bedingten Enzymmangels unterscheiden. Für den schweren MTHFR-Mangel, bei dem die restliche Enzymaktivität nur 0 – 20% beträgt, kennt man bisher 9 Mutationen [51]. Er tritt sehr selten auf, ruft dann aber die schwerste Form der Homocystinurie hervor [37].

Große Bedeutung hingegen hat der autosomal-rezessiv vererbte Mangel an thermolabiler MTHFR, der 1988 erstmals von Kang et al. beschrieben wurde. 1995 wiesen Frosst et al. [51] erstmals die dafür verantwortliche Punktmutation (C677T) nach, durch welche im Enzym die Aminosäure Alanin durch Valin ersetzt wird. Diese autosomal-rezessiv vererbte Punktmutation C677T in der Region der Folsäurebindungsstelle im MTHFR-Gen verursacht eine Hyperhomocysteinämie.

Diese thermolabile Variante des Enzyms MTHFR besitzt weniger als 50% der Aktivität des Wildtyps [37]. Dies hat bei Homozygoten eine Erhöhung der Plasmakonzentration von HC von etwa 25% zur Folge, verglichen mit Heterozygoten und Nicht-Mutierten. Dieser Gendefekt soll mit einer Prävalenz von 4 – 10% die häufigste genetisch bedingte Ursache der milden Hyperhomocysteinämie sein [92]. Die Häufigkeit der Mutation ist regional sehr unterschiedlich und schwankt zwischen 1,4 und 15% [29].

Der Mangel an thermolabiler MTHFR führt bei Homozygotie zu klassischen Homocysteinämie. Diese ist charakterisiert durch Linsenektopie, Oligophrenie, Osteoporose,

Skelettfehlbildungen und gehäufte thrombembolische Ereignisse. Bei den betroffenen Patienten sind die Homocysteinwerte im Plasma mit $> 400 \mu\text{mol/l}$ massiv erhöht.

2.5.3 Cystathionin- β -Synthase

Die Cystathionin- β -Synthase (CBS) ist ein Enzym des Transsulfurierungsweges.

HC wird durch Sulfidgruppenübertragung über Cys zu Cystein umgewandelt. Die CBS benötigt als Kofaktor Vitamin B6 (= Pyridoxalphosphat). Eine Störung auf einer Stoffwechselstufe führt zu einer Akkumulation von HC im Plasma, sei die Störung durch hereditäre Enzymdefekte oder ernährungsbedingten Mangel an Kofaktoren verursacht.

Das Gen für die CBS liegt auf Chromosom 21. Bisher sind 17 verschiedene Mutationen beschrieben worden [51], die in Abhängigkeit von der Residualaktivität des Enzyms und der daraus resultierenden Homocystein-Konzentration unterschiedlich schwer ausgeprägte Krankheitsbilder zur Folge haben.

Der homozygot vererbte schwere Enzymmangel ist Ursache für die klassische Homocysteinurie, die mit einer Prävalenz von 1:332000 [57] auftritt und häufig bereits in jungen Jahren zum Tode führt.

Ob nun auch der heterozygot vererbte CBS-Mangel klinische Bedeutung hat, ist bisher noch umstritten.

Ein autosomal-rezessiv vererbter Mangel an Cystathionin- β -Synthase wurde 1962 bei geistig retardierten Kindern beschrieben, welche an ausgedehnten arteriellen und venösen Gefäßthrombosen bei Homocystinurie litten [18, 66]. Der Mangel an CBS ist selten und betrifft weltweit etwa 1/300 000 Personen, allerdings bestehen hier große Schwankungen zwischen den Populationen (1/60 000 Iren, 1/900 000 Japaner). Auch dieser autosomal-rezessiv vererbte Mangel führt bei Homozygotie zur Homocystinurie, Linsenektopie, Oligophrenie, Osteoporose, Skelettfehlbildungen und thrombembolischen Ereignissen.

2.5.4 Cystathionin-Lyase

Das Enzym Cystathionin-Lyase hydrolysiert Vitamin B6-abhängig Cys zu Cystein und Homoserin.

Cys ist also Substrat für die Cystathionin-Lyase (Cystathioninase) und für einen Enzymmangel besonders sensitiv. Bei einer reduzierten Enzymaktivität ist das Cys bereits erhöht, noch bevor HC ansteigt. Da verminderte Vitamin B6-Konzentrationen im Serum zu einem Anstieg von Cys führen [85], ist davon auszugehen, dass die Cystathionin-Lyase eine

höhere Vitamin B6-Abhängigkeit als die Cystathionin-Synthase aufweist. Vitamin B6 senkt das Cys im Serum und zeigt somit eine stimulierte Enzymaktivität der Cystathionin-Lyase an. Homoserin wird weiter zu α -Ketobutyrat und Propionyl-CoA abgebaut.

Das beim Abbau von Propionyl-CoA entstehende Methylmalonyl-CoA erfordert für die weitere Nutzung im Stoffwechsel eine Umsetzung mit Hilfe des Enzyms Methylmalonyl-CoA-Mutase. Fehlt diese Funktion, so steigt die Konzentration der Methylmalonsäure (MMA). Die Methylmalonyl-CoA-Mutase ist von einer weiteren Coenzymform des Vitamin B12, dem Desoxyadenosylcobolamin, abhängig. Mit dessen Hilfe wird Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA isomerisiert. Liegt eine Minderaktivität dieses Enzyms vor, lässt sich dies mit der Bestimmung der MMA im Serum ermitteln. So können Mangelzustände des Vitamin B12 bestimmt werden. Der metabolisch manifeste B12-Mangel kann sich zum Beispiel negativ auf den Knochenstoffwechsel auswirken und zur Stimulation von Osteoklasten führen [40].

Ein Mangel der Methylmalonyl-CoA-Mutase Aktivität führt zur Methylmalonazidurie [32]. Es kommt im Stoffwechsel zu einer Akkumulation von Methylmalonyl-CoA. Diese Anhäufung führt zu Intoxikationen, die sich in metabolischen Krisen äußert und innerhalb kürzester Zeit zu schweren Schädigungen des Gehirns oder zum Tode führen. Wie andere Organoazidurien tritt die Methylmalonazidurie akut neonatal auf oder manifestiert sich erst nach Monaten oder Jahren. Einige Fälle dieser Krankheit können erfolgreich mit Vitamin B12 (= Cobalamin) behandelt werden, wenn nicht das Enzym selbst sondern die Bildung des Kofaktors gestört ist.

2.6 Osteoporose und Homocystein

2.6.1 Osteoporose

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, charakterisiert durch eine verringerte Knochenmaterialqualität und Strukturveränderungen der Mikroarchitektur des Knochengewebes - wobei das Ausmaß der Veränderung der Mikroarchitektur bei einer verminderten Knochenmasse sehr unterschiedlich ausfallen kann [68] - nicht aber ist die Zusammensetzung des Knochens verändert ist. Es resultiert eine gesteigerte Knochenbrüchigkeit und eine Frakturgefährdung, wobei die Knochenfestigkeit das Zusammenspiel von Knochendichte und Knochenqualität widerspiegelt. Auch die

Knochengröße findet in der Definition der Osteoporose über die Flächendichte in der Knochendichtemessung mittels DXA zumindest teilweise eine Berücksichtigung [54].

Somit umfasst die Osteoporose zum einen Erkrankungen, bei denen die Knochenmasse vermindert ist und zum anderen, bei denen strukturelle Komponenten des Knochengewebes beeinträchtigt sind.

Liegt eine Osteoporose vor und sind bereits eine oder mehrere Frakturen aufgetreten, spricht man von einer manifesten Osteoporose. Frakturen können neben der akuten Schmerzsymptomatik Behinderung und erhöhte Mortalität nach sich ziehen. Typischerweise manifestieren sich osteoporotische Frakturen am distalen Radius, am proximalen Femur und an den Wirbelkörpern. Prinzipiell können diese Frakturen jedoch jeden Knochen betreffen [2]. Typische Veränderungen der Wirbelsäule sind Fisch- oder Keilwirbel, die durch Einbrüche der Wirbelkörper, auch ohne vorangegangenes Trauma, entstehen. Diese Sinterungsfrakturen führen häufig zu akuten bzw. chronischen Rückenschmerzen und somit zu einer Beeinträchtigung der Funktionalität und der Lebensqualität. Außerdem kann es zu einer Abnahme der Körpergröße und dadurch zu funktionellen Beschwerden der Lunge und des Gastrointestinaltraktes kommen. Die Größe der Knochenausgangsmasse und das Ausmaß und die Dauer des Knochenmasseverlustes bestimmt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Osteoporose. Die WHO hat 1994, basierend auf dem Mittelwert der Knochendichte gesunder prämenopausaler Frauen (T-Score), für Dual X-ray Absorption (DXA)-Messungen folgende Bereiche festgelegt:

Stadium	Knochendichte (T-Wert)
Normalbefund	Knochenmineralsalzgehalt unverändert (bis -1,0)
Osteopenie	Knochenmineralsalzgehalt vermindert keine Frakturen (-1,0 bis -2,5)
Präklinische Osteoporose	Knochenmineralsalzgehalt vermindert keine Frakturen (> -2,5)
Klinische (manifeste) Osteoporose	Knochenmineralsalzgehalt vermindert Wirbelfrakturen (auch ohne adäquates Trauma) (> -2,5)

Diese Definition basiert ausschließlich auf Knochendichte-Messwerten und nicht auf klinischen Kriterien. Der T-Score bezeichnet die Abweichungen vom Mittelwert (1 SD = 1 Standardabweichung) des perimenopausalen Maximums („peak bone mass“) auf Basis DXA-gemessener Knochendichte. Allerdings haben sich seit dieser Festlegung der WHO-Definition die Referenzkollektive zum Teil geändert, so dass eine medikamentöse Therapie nach der aktuellen DVO-Leitlinie bei einer singulären inadäquaten Wirbelkörperfraktur 2. oder 3. Grades nach Genant (25 – 40 % beziehungsweise >40% Höhenminderung) oder multiplen Wirbelkörperfrakturen und einem T-Wert von –2,0 oder geringer empfohlen wird.

Die schlechte Skelettarchitektur bringt es mit sich, dass viele Osteoporose-typische Frakturen bei Patienten auftreten, deren T-Wert in der DXA nur osteopenische Messwerte aufweisen [83].

Grundsätzlich werden nach den Leitlinien des DVO für alle Risikopersonen basistherapeutisch Maßnahmen zur Frakturprophylaxe empfohlen. Diese Maßnahmen beinhalten zum einen die psychosoziale Betreuung nach Stürzen und Frakturen, Hilfe zum Erhalt der individuellen Eigenständigkeit und Selbsthilfegruppen und zum anderen, wenn möglich eine Therapieumstellung bei Einnahme von Medikamenten (zum Beispiel Glitazone bei weiblichen Personen und Glukokortikoide), welche einen Knochendichteverlust beziehungsweise das Auftreten von Frakturen begünstigen. Zudem sollte eine ausreichende Versorgung mit Kalzium und Vitamin D erfolgen, falls nötig auch durch Substitution erreicht werden.

Im zweiten Schritt ist es notwendig sekundäre Ursachen, wie zum Beispiel Hyperthyreose, Androgenmangel, Hyperparathyreoidismus, gastrointestinale Erkrankungen, welche ein erhöhtes Frakturrisiko mit sich bringen, zu diagnostizieren und adäquat zu behandeln.

Eine spezifische Osteoporose-Therapie kommt nach dem DVO zum Einsatz, „wenn das auf der Grundlage der derzeit verfügbaren epidemiologischen Daten geschätzte 10-Jahresrisiko für Wirbelkörper- und proximale Femurfrakturen > 30% beträgt und die T-Werte der DXA-Knochendichtemessung an der LWS, am proximalen Gesamtfemur oder am Schenkelhals erniedrigt sind“. Weiterhin wird auch eine medikamentöse Therapie bei T-Werten von – 1,5 oder geringer bei gleichzeitigem Vorhandensein von Risikofaktoren (allgemein: Immobilität, Nikotinkonsum, multiple Stürze, periphere Fraktur nach dem 50. Lebensjahr und andere; durch Krankheiten: zum Beispiel Diabetes mellitus, Rheumatoide Arthritis, Cushing-Syndrom, Epilepsie und weitere) empfohlen.

Die Osteoporose tritt vorwiegend bei Frauen nach Beginn der Menopause auf. Die Prävalenz liegt hier bei circa 7% im Alter von 55 Jahren und steigt auf etwa 20% im Alter von 80

Lebensjahren an. Für die Prävalenz einer Osteoporose bei Männern liegen keine zuverlässigen Angaben vor.

Eine Osteoporose ohne Frakturen ist asymptomatisch. Sie manifestiert sich klinisch erst durch das Auftreten von Frakturen. Die Wirbelkörperfraktur ist die häufigste osteoporosebedingte, die proximale Femurfraktur die folgenschwerste Frakturform [72].

Die Inzidenz nachweisbarer Wirbelkörperbrüche und der aufgrund eines Bagateltraumas aufgetretenen peripheren Frakturen beträgt bei Frauen ungefähr 1% beziehungsweise 1,9%, während die Inzidenz bei Männern gleichen Alters bei 0,6% beziehungsweise 0,7% beträgt. Die Inzidenz beider Manifestationsformen nimmt mit steigendem Lebensalter exponentiell zu. Da im Einzelfall nach einem Bagateltrauma schwer abzuschätzen ist, wie hoch die Krafteinwirkung, welche zu einem peripheren Knochenbruch geführt hat, tatsächlich war, haben diese Frakturen keine so hohe Aussagekraft als Risikofaktor wie eine Sinterungsfraktur der Wirbelsäule, da diese eindeutiger mit einer verminderten Knochenfestigkeit assoziiert ist. Allerdings haben auch Patienten mit peripheren Frakturen infolge eines adäquaten Traumas im Durchschnitt eine verminderte Knochendichte [56], so dass hier im Einzelfall über eine weiterführende Osteoporosediagnostik entschieden werden muss.

Für das Auftreten einer Osteoporose sind folgende Ursachen bekannt beziehungsweise werden diskutiert:

Die häufigste Ursache ist der Östrogenmangel bei Frauen nach der Menopause. Unter Umständen ist auch der Zeitpunkt der Menarche bedeutsam; bei Frauen bei Menarche bis zum 12. Lebensjahr wird im Vergleich zu Frauen mit Menarche nach dem 15. Lebensjahr im 6. Dezennium häufig keine Knochendichte im Frakturrisikobereich gemessen.

Etwa 10 Jahre nach Einstellung der Hormonproduktion kann der erste Knochenbruch, meist der Wirbelkörper, auftreten. Es wird folgender Ablauf angenommen: Durch den postmenopausalen Östrogenabfall kommt es zu einem Ausstrom von Kalzium aus dem Skelett in das Serum und als Folge resultiert ein Abfall des Parathormons und des aktiven Vitamin-D-Metaboliten, des 1,25-D₃-Hormons. Dies ist ein physiologischer Regulationsvorgang, von dem vorwiegend die Spongiosa betroffen ist. Je nach Reaktionsbeziehungsweise Unfallmechanismus sind Frakturen des Radius und Sinterungen (= strukturelles Nachgeben von Wirbelkörpern) und Frakturen der Wirbelkörper die Folge.

Zudem spielt eine Fehlernährung in Form eines Mangels an Kalzium und Vitamin D oder eine phosphathaltige Nahrung eine Rolle bei der Entstehung einer Osteoporose.

Hier wird bei einer medikamentösen Osteoporosetherapie eine Supplementierung des Kalzium und Vitamin D₃ (je nach Mangelsituation zwischen 400 und 1200 I.E.) angestrebt.

Es gibt keine Untersuchungen darüber, ob die Fraktur-senkende Wirkung der Osteoporose-Medikamente bei einer nicht optimalen Kalzium- und Vitamin D₃-Versorgung anders wäre.

Aus Störungen des Stoffwechsels von Cholecalciferol (Vitamin D₃) und Kalzium resultieren pathologisch erhöhte Spiegel des Parathormons (sekundärer Hyperparathyreoidismus). Im Skelett ist nun nicht mehr nur die Spongiosa betroffen, sondern auch die Kompakta, so dass es zusätzlich zu Wirbelfrakturen auch zu Schenkelhalsfrakturen (in den meisten Fällen) kommen kann.

Dieser Mechanismus bedingt, dass Wirbelkörperfrakturen zeitlich meist früher auftreten als Schenkelhalsfrakturen.

Ein weiterer Risikofaktor stellt die Immobilisation dar und sollte daher, wenn möglich, vermieden werden. Zum Beispiel kommt es bei absoluter Bettruhe nach etwa 4 Wochen zu einer Abnahme der trabekulären Knochendichte um bis zu 18%. Die Reversibilität einer Immobilisationsosteoporose ist bei Patienten über 60 Jahre und bei einer Immobilisierung, die länger als 4 Monate gedauert hat, eingeschränkt. Es werden sportliche Aktivitäten empfohlen, welche die Muskulatur beanspruchen und somit den Knochenaufbau fördern.

Auch werden genetische Faktoren als Ursache diskutiert. Ein familiär gehäuftes Auftreten einer Osteoporose wird anamnestisch durch eine proximale Femurfraktur bei Mutter oder Vater als prognostisch verlässlich angegeben.

Weiter stellen Alkohol- und Nikotinabusus ein Risikofaktor dar. Durch das Rauchen wird der Knochen durch mangelnde Versorgung geschädigt, so dass der jährliche Knochenverlust bei Rauchern doppelt so hoch ist als bei Nichtrauchern.

Bei erhöhtem Alkoholkonsum wird zum Beispiel beim Abbau des Alkohols Parathormon verbraucht, welches im Zusammenspiel mit Calcitonin die Aufnahme von Kalzium steuert.

Bei der sekundären Form der Osteoporose sind folgende Ursachen bekannt: Glucocorticoidtherapie, Cushing-Syndrom, Immobilisierung, rheumatische Erkrankungen, Diabetes mellitus, Hyperthyreose, Hypogonadismus, streng veganische Kost, Malabsorption.

2.6.2 Osteodensitometrie

Als Osteodensitometrie oder Knochendichtemessung werden medizinisch-technische Verfahren bezeichnet, die der Bestimmung der Dichte beziehungsweise des Mineralsalzgehaltes (vor allem Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat) des Knochens meist am Oberschenkelhals oder an der Lendenwirbelsäule dienen.

Die DXA-Methode ist die am weitesten verbreitete Messmethode und gilt nach wie vor als Standard, da sie eine strahlenarme, sehr genaue Messung aller relevanten Skelettareale erlaubt.

Bei der DXA-Messung werden gleichzeitig zwei energetisch leicht unterschiedliche Röntgenquellen eingesetzt. Die Absorptiometrie misst nicht die eigentliche Knochendichte, sondern die Abschwächung monochromatischer Strahlung im Durchgang durch ein Messvolumen. Dabei ist eine getrennte Evaluation von trabekulärem und kortikalem Knochen nicht möglich. Eine zu diagnostischen Zwecken verwendbare Bildgebung (Strukturanalyse) entfällt ebenfalls. Die Knochendichte wird bei der DXA in g/m^2 , das heißt als Flächenwert, gemessen. Der Bone Mineral Density (BMD) ist eine Messwert-Darstellung (Flächenwert), welcher Rückschlüsse auf die Festigkeit beziehungsweise Brüchigkeit der Knochen zulässt. Je mehr Kalzium in die Knochensubstanz eingelagert ist, desto höher ist der BMD. Der osteoporotische Knochen ist mit seinen verminderten Mineralsalzgehalt durch einen niedrigen BMD gekennzeichnet.

Im Befund sollte keine absolute Dichte oder Flächendichte angegeben werden, sondern der sogenannte T-Score. Der T-Score ist die Abweichung eines Knochendichte-Messwertes in Standardabweichungen vom Mittelwert der maximalen Knochendichte einer gleichgeschlechtlichen Population, die im jungen Erwachsenenalter (etwa 35 Jahre, Alter der maximalen Knochendichte) gemessen wird. Zum einen wird mittels Osteodensitometrie überprüft, ob mit einem T-Score von $< -2,5$ eine Osteoporose nach WHO-Definition vorliegt beziehungsweise die Kriterien einer belegten Wirksamkeit einer spezifischen medikamentösen Therapie bei einem T-Score < -2 erfüllt werden. Zum anderen wird mit dieser Messung das Ausmaß der Erniedrigung der Knochendichte erfasst, was für das individuelle Frakturrisiko und die weiterführende Therapie von Bedeutung ist.

Nach den aktuellen Leitlinien des Dachverbandes Osteologie (DVO) erhöht sich das relative Frakturrisiko pro Erniedrigung um einen T-Score für alle Frakturen um den Faktor 1,5 bis 2,5 für proximale Femurfrakturen.

Am proximalen Femur sind die T-Werte der Gesamtfemurregion („Total Hip“) und des Schenkelhalses für die Risikobeurteilung und Kontrolle der Therapie-Effekte am besten geeignet, wobei für diagnostische Zwecke die Knochendichtemessung an einer Hüfte ausreichend ist.

Um das 10-Jahres-Frakturrisiko abzuschätzen, wurde in der Leitlinie der DVO der niedrigste T-Score der DXA-Messungen von Lendenwirbelsäule, Total Hip und Schenkelhals zugrunde gelegt. An der Lendenwirbelsäule wird der mittlere T-Wert der Wirbel L1 – L4 ermittelt, an

denen eine artefaktarme Messung möglich ist. Es müssen mindestens zwei Wirbelkörper beurteilbar sein.

Die wichtigste Indikation ist weniger die Diagnosestellung einer Osteoporose, als vielmehr die Einschätzung des aktuellen und zukünftigen Frakturrisikos. Das aktuelle Frakturrisiko hängt vor allem von der Höhe der Knochenmasse und der Integrität der Knochenmikroarchitektur ab.

Die Knochendichtewerte sind nach Hillier et al., wenn nicht besondere Ereignisse wie schwerer Vitamin D-Mangel, längere Immobilität, systemische Glukokortikoidtherapie eintreten, bei über 60jährigen relativ stabil, so dass wiederholte Messungen nur bei besonderer Indikation sinnvoll sind [44]. Eine Reevaluierung mit Erfassung von Schmerzen, Risikofaktoren, Funktionalität, Körpergewicht und -größe und Umsetzung der Basismaßnahmen sollte bei allen Patienten regelmäßig durchgeführt werden, ganz gleich, ob sie eine medikamentöse Therapie erhalten oder nicht. Eine radiologische Kontrolluntersuchung mittels DXA wird für Patienten ohne medikamentöse Therapie nicht vor 2 – 5 Jahren empfohlen, es sei denn, es wird seit der vergangenen Untersuchung eine Abnahme der Körpergröße von mehr als 2 cm dokumentiert oder es treten akute Rückenschmerzen auf. Bei Patienten mit medikamentöser Therapie wird generell eine erneute DXA-Messung nach 2 Jahren empfohlen.

Konventionell röntgenologisch ist eine pathologische Demineralisation erst bei Mineralverlusten zwischen 30 und 50% erkennbar, hier ist das Frakturrisiko bereits deutlich erhöht und die Knochenstruktur ist irreversibel geschädigt. Kleinere Änderungen in der Mineralisation sind radiologisch nicht erfassbar.

2.6.3 Pyridinolin und Desoxypyridinolin

Kollagen, die Hauptkomponente der organischen Knochenmatrix, besteht aus 3 Polypeptidketten, die in einer Dreierhelix verflochten sind und durch Querverbindungen, den sogenannten Crosslinks (CL), stabilisiert werden. Diese aminosäure-ähnlichen CL werden von Kollagenfibrillen durch Kondensation von Lysin- oder Hydroxylysin gebildet und werden Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) genannt. Sie liegen im molaren Verhältnis von 3,5 : 1 [89] vor. Es handelt sich um 3-Hydroxypyridin-Crosslinks des reifen Kollagens. Ein Abbau des Knochens geht mit einer Freisetzung von PYD und DPD einher. Diese entstehen nicht aus neu synthetisiertem Kollagen, sondern stammen ausschließlich aus dem

Abbau extrazellulären Kollagens. Während Desoxypyridinolin zu etwa 98 % im Knochen und nur 2 % im Dentin vorkommt, findet sich Pyridinolin auch im Knorpel, in Sehnen und perivaskulär [25]. Da der Kollagenumsatz im Knochengewebe den der anderen genannten Gewebe deutlich übersteigt und die CL auch nicht mit der Nahrung aufgenommen werden, können sie aber als spezifische Marker der Knochenresorption angesehen werden [31]. Zudem konnte eine hohe Korrelation zwischen PYD und DPD aufgezeigt werden, so dass beide Marker ungefähr die gleiche Aussagekraft besitzen [6]. Eine Ausnahme bilden hier die entzündlich-rheumatischen Erkrankungen mit starker Knorpeldegeneration, bei denen PYD keinen guten Marker darstellt, da bei verstärktem Knorpelabbau, wie zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis, relativ viel PYD ausgeschieden wird.

Beide Komponenten werden bei der Kollagendegeneration freigesetzt und renal ausgeschieden. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Knochenresorptionsrate und der renalen Ausscheidung der CL.

Pyridinolin, vor allem aber Desoxypyridinolin werden zur Evaluation des Knochenstoffwechsels bei Osteoporose empfohlen und sind zur Verlaufskontrolle der Abbauprodukt bei postmenopausaler Osteoporose geeignet.

Die folgenden Referenzbereiche entstammen den Angaben des bestimmenden Labors der Universität Jena.

Pyridinolin	w	25 – 83 nmol/mmol Kreatinin
	m	23 – 65 nmol/mmol Kreatinin
Desoxypyridinolin	w	6 – 23 nmol/mmol Kreatinin
	m	6 – 26 nmol/mmol Kreatinin
P/D-Quotient 2,5 – 6,0		

Eine erhöhte Ausscheidung von PYD und DPD findet sich bei unbehandelter Osteoporose. Zudem wird ein 2fach erhöhter Normbereich mit Eintritt der Menopause diskutiert.

2.6.4 Knochenstoffwechsel

Für den Knochenstoffwechsel sind unmittelbar nur zwei Zelltypen verantwortlich: Osteoblasten und Osteoklasten. Osteozyten stellen nichts anderes dar als Osteoblasten, die sich selbst eingemauert haben; sie bleiben durch lange Zellfortsätze miteinander verbunden und bilden so ein Netzwerk, durch das sie Ionen weiterreichen können. Osteozyten können

mechanische Belastungen rezipieren und entsprechende Signale zum Knochenaufbau weiterleiten.

Zusätzlich zu der in Klammern angegebenen Literatur wurde für die Ausführungen der Marker der Knochenbildung und des Knochenabbaus das Journal für Mineralstoffwechsel herangezogen.

Osteoblasten differenzieren aus Knochenmark-Stromazellen. Sie produzieren die Proteine der Knochengrundsubstanz, die in ihrer Gesamtheit als Osteoid bezeichnet werden.

1. Marker der Knochenbildung:

Alkalische Phosphatase (AP) werden Enzyme genannt, welche Phosphorsäureester hydrolysieren. Sie dephosphorylieren viele Arten von Molekülen wie Proteine, Nukleotide und Alkaloide und arbeiten am effektivsten bei alkalischem pH-Wert. Die alkalische Knochen-Phosphatase, genannt Ostase, wird von den Osteoblasten in der Phase der Kollagenreifung abgegeben und korreliert gut mit der Knochendichte [5]; sie ist bei der Osteoporose erhöht [14].

Zusätzlich nehmen Osteoblasten Ca^{2+} und Phosphat auf und sezernieren diese gezielt, so dass lokal eine Übersättigung eintritt und durch Ausfallen die neugebildete Grundsubstanz mineralisiert wird. Eine noch nicht ausreichend verstandene Rolle bei diesem Prozess spielt die an der äußeren Osteoblasten-Zellmembran lokalisierte alkalische Phosphatase, die Phosphat-Ionen möglicherweise durch Abspaltung von phosphorylierten organischen Molekülen und durch Spaltung von Pyrophosphat zur Verfügung stellt.

Osteocalcin ist ein kleines Protein und wird in Osteoblasten Vitamin K-abhängig auf Glutaminsäureresten carboxyliert. Glutaminsäure enthält eine COO^- -Gruppe als Ende der Seitenkette, durch die Carboxylierung kommt nun eine zweite hinzu. Diese beiden negativen Ladungen sind ein idealer Anlagerungsplatz für das zweifach positiv geladene Kalzium-Ion (Ca^{2+}), das dadurch lokal konzentriert und (mit Hilfe des integrin-binding sialoprotein) zum Kristallisationskeim für weitere Ca^{2+} - und Phosphatmoleküle in Form des Hydroxylapatits $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Osteocalcin gewährleistet damit, dass das schwer lösliche Ca-Phosphat im Knochen und nicht an anderen Stellen des Körpers ausfällt. Ein Anstieg des untercarboxylierten Osteocalcin ist vermutlich ein Marker für einen bestehenden Vitamin K-Mangel als auch für ein erhöhtes Frakturrisiko [86]. Ein zweites Vitamin, nämlich Vitamin D, ist wichtig für Osteocalcin: seine Transkription wird durch den aktivierten Vitamin D-

Rezeptor stimuliert. Osteocalcin im Serum stellt einen spezifischen Marker der Knochenbildung dar, solange das physiologische Coupling besteht, denn der gemessene Wert setzt sich aus neugebildetem und aus resorbiertem Osteocalcin zusammen [22].

Osteonectin ist ein weiterer Osteoidanteil, der sowohl Hydroxylapatit als auch Kollagen bindet und damit zur Verbindung von organischen und anorganischen Anteilen der Matrix beiträgt.

Prokollagen Typ I Propeptide (NPIP oder CPIP): Das Knochenkollagen (= Kollagen Typ I) macht einen Großteil der Proteinmatrix aus. Es besteht aus zwei α_1 -Ketten und einer α_2 -Kette, die posttranslational auf Lysinen und Prolinen hydroxyliert werden und noch im endoplasmatischen Retikulum des Osteoblasten eine Prokollagen-Tripelhelix bilden. Diese Prokollagen-Monomere werden sezerniert. Extrazellulär werden die N- und C-terminalen Prokollagen-Peptide abgespalten und diese sind im Serum als Amino (N)-terminales Propeptid (NPIP) und Carboxy (C)-terminales Propeptid (CPIP) messbar. Das CPIP entsteht äquimolar mit Kollagen nur bei der Neubildung von Knochen und wird nicht in den Knochen eingebaut, so dass es unter Umständen ein Marker der Knochenformation ist [26]. Nach Abspaltung der Prokollagen-Peptide lagern sich spontan viele Tripelhelix-Monomere zu langen Fibrillen zusammen, die über die hydroxylierten Lysine kovalent quervernetzt werden. Als Coenzym für die Hydroxylierung wird Vitamin C benötigt, so erklärt es sich, dass ein Vitamin C-Mangel durch Instabilität des schlecht quervernetzten Kollagens zu Skorbut führt.

Osteoklasten sind große, mehrkernige Zellen, die im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen entstehen. Der Knochenabbau erfolgt wie ein lysosomaler Abbau durch Ansäuerung und Aktivierung von Hydrolasen. Osteoklasten schließen einen bestimmten Bereich mineralisierter Knochenoberfläche ab und säuern ihn durch eine Protonenpumpe an. Die Ansäuerung führt zur Auflösung der Hydroxylapatit-Kristalle und löst damit Ca^{2+} aus dem Knochen. Eine konzentrierte Steigerung der Osteoklasten-Aktivität steigert daher die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration.

2. Marker des Knochenabbaus:

Hydroxyprolin entsteht durch Hydroxylierung der im Kollagen vorkommenden Aminosäure Prolin. Hydroxyprolin wird während der Degradation von Kollagen freigesetzt und gelangt über die Blutbahn in den Harn. Die Hydroxyprolin-Ausscheidung korreliert mit der

Knochenresorption und kann im 24 h-Urin bestimmt werden. Da Hydroxyprolin nicht knochenspezifisch ist, sondern auch in anderen kollagenen Geweben wie zum Beispiel der Haut vorkommt, kann der Knochenabbau nur relativ unspezifisch erfasst werden.

Type I Kollagen Crosslink Telopeptide stellen eine alternative Methode zur Erfassung der Hydroxypyridinium-Crosslinks dar. Die Crosslinks sind an Peptide von Typ I-Kollagen gebunden (Carboxy (C)- oder Amino (N)-terminale Telopeptide) und werden, teilweise an Telopeptide gebunden, beim Knochenabbau freigesetzt und ausgeschieden. Die Bestimmung von ICTP (Typ I-Kollagen C-terminales Crosslink-Telopeptid) erfolgt im Serum, die Bestimmung von CTX (carboxyterminale Crosslink-Telopeptide, CrossLaps) [23, 76] und NTX (aminoternale Crosslink-Telopeptide, Osteomark) ist im Serum oder im Harn möglich.

Tartratesistente saure Phosphatase (TRSP, TRAP) ist ein Isoenzym der sauren Phosphatase, das vor allem in Osteoklasten gebildet wird. Bei knochenresorptiven Prozessen steigt die Konzentration dieses Enzyms im Serum deutlich an, Daher kann TRAP als direkter Knochenabbaumarker verwendet werden. Da bisherige Assays eine unzureichende Sensitivität und Spezifität hatten, hat die Bestimmung der TRAP jedoch noch keinen Eintritt in die klinische Routine gefunden.

2.6.5 Homocystein als Risikofaktor der Osteoporose

Eine Hyperhomocysteinämie geht wahrscheinlich auch mit einer Osteoporose einher.

In neueren Studien geht hervor, dass ein erhöhter HC-Spiegel, welcher beispielsweise als Folge eines Folsäure-Mangels auftreten kann, mit einem gesteigerten Osteoporoserisiko assoziiert ist.

In einer Langzeitstudie (Dauer 5,7 bis 8,1 Jahren) mit Probanden im Alter von 50 bis 90 Jahren konnte gezeigt werden, dass die höchsten HC-Werte mit einem 1,9fach höheren osteoporosebedingten Frakturrisiko einhergehen [46].

Eine weitere Langzeitstudie über einen Zeitraum von 12 Jahren kam zu vergleichbaren Ergebnissen [63]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Hyperhomocysteinämie und ein Vitamin B12-Mangel zu einer Minderung der Knochendichte und somit zu einer Osteoporose führen können. So kam es bei Frauen in der Postmenopause, die einen erhöhten HC-Spiegel zeigten, vermehrt zu Hüftgelenksfrakturen [53]. Einer deutschen Forschungsgruppe gelang der Nachweis, dass erhöhte Konzentrationen von

Homocystein in menschlichen Zellkulturen zu einer starken Stimulation der Osteoklastenaktivität führen, wohingegen die Osteoblastenaktivität nur wenig angeregt wurde [41]. Ein erhöhter HC-Spiegel stört offenbar das Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten und führt letztlich zu einem Knochenabbau.

2.7 Einfluss einer Vitaminsubstitution auf die Konzentration von Homocystein

Ausgehend von der Hypothese des Vitaminmangels wird die Vitaminsubstitution zur Therapie der Hyperhomocysteinämie empfohlen. Hiermit soll die konsequente Senkung des Risikofaktors HC erreicht werden. Nach den Empfehlungen der Deutschen Ernährungsgesellschaft sollte eine Vitaminsubstitution von 400 µg Folsäure, 2 mg Vitamin B6 und 6 µg Vitamin B12 täglich erfolgen. Bei diesen Mengen ließ sich eine signifikante Senkung der HC-Konzentration bei gesunden Menschen verzeichnen [70].

Eine orale Substitution aus der Kombination 1 mg Folsäure, 0,4 mg Vitamin B12 und 10 mg Vitamin B6 täglich, senkte die HC-Spiegel nach etwa 6 Wochen um 50%. Dies ist vergleichbar mit dem therapeutischen Effekt einer Monotherapie mit 5 mg Folsäure nach 2 Wochen [11], wohingegen eine Monotherapie mit Vitamin B6 oder Vitamin B12 keinen nennenswerten Therapieerfolg ergab.

2.8 Bestimmungsmethoden des Homocysteins im Plasma

Für die Bestimmung des Gesamt-Homocysteins im Plasma und/oder Serum wurden mehrere Methoden etabliert:

Aminosäureanalyse (Ionenaustauschchromatographie) die Erstbeschreiber der Homocystinurie hatten die Aminosäure 1962 im Urin bestimmt. Diese Methode war jedoch wenig sensitiv.

Enzymimmunoassay/Radioenzymimmunoassay Refsum stellte 1985 einen radioenzymatischen Assay vor, der einen Reduktionsschritt bei der Aufarbeitung der Proben beinhaltet. Damit konnte nun das Gesamt-HC erfasst werden, während vorher nur das als Disulfid-gebundene und das freie HC, die kleinere im Plasma vorkommende Fraktion, erfasst worden waren. Die Homocystein-Bestimmung wurde sensitiver und verlässlicher.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatographie = HPLC) mit elektrochemischer oder Fluoreszenzdetektion.

Alle Methoden zur Bestimmung des Gesamt-HC bedienen sich einer vorherigen Reduktion, damit die oxidierten Formen des HC in die freie, reduzierte Form überführt werden. Dabei erfolgt die Befreiung des HC durch Zugabe eines Reduktionsmittels (zum Beispiel Dithiothreitol) aus seiner Plasmaproteinbindung oder aus Disulfiden. Die weiteren Schritte der Probenvorbereitung sind methodenabhängig.

2.9 Referenzbereiche

Für das Homocystein und seine Metabolite Methionin, Cystathionin und Dimethylglycin wurden folgende Referenzbereiche ermittelt [1, 52, 85]; die Referenzintervalle der Vitamine Folsäure, Vitamin B12 und Vitamin B6 wurden der allgemeinen Literatur entnommen.

Methionin	13,3 – 42,7 µmol/l
Homocystein	5,4 – 14,6 µmol/l
Cystathionin	65 – 301 nmol/l
Dimethylglycin	> 2 µmol/l
Folsäure	3,4 – 38 nmol/l
Vitamin B12	118 – 716 pmol/l
Vitamin B6	8,7 – 27,2 µg/l

3. Zielstellung der Arbeit

Ein erhöhter HC-Wert im Serum stellt einen Risikofaktor bei den verschiedensten Erkrankungen dar.

Bei der Osteoporose soll eine erhöhte Serumkonzentration des HC das Auftreten einer Niedrigenergie-Fraktur begünstigen.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit ist es herauszufinden, ob ein erhöhter HC-Wert im Serum das Risiko des Auftretens einer auf die Osteoporose zurückzuführende Fraktur steigert.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Hatten die Patienten, bei welchen eine erhöhte HC-Konzentration im Serum nachgewiesen werden konnte, anamnestisch im Krankheitsverlauf eine Niedrigenergiefraktur erlitten?
2. Welcher Zusammenhang besteht zwischen HC und den Vitaminen B12 und Folsäure?
3. Korrelieren die Messwerte der Metaboliten Cystathionin, Dimethylglycin und Methionin mit der HC-Konzentration und welche Bedeutung ist dem zuzuschreiben?
4. Zeigten die Osteoporose-Patienten, als Ausdruck eines gesteigerten Knochenabbaus, eine erhöhte Ausscheidung von Kollagen-Crosslinks im Urin und korrelieren diese Werte mit der Konzentration des HC im Serum?
5. Steigt die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten HC-Konzentration im Serum mit zunehmendem Lebensalter?
6. Gibt es geschlechtliche Unterschiede bei den Nachweisen eines erhöhten Homocystein-Spiegels und einer Fraktur?

Die Beantwortung dieser Fragen erfolgt im Kapitel 6. Diskussion.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Lösungen

Probenvorbereitung

Die zur Probenvorbereitung genutzten Lösungen wurden mit Essigsäure 99 – 100% und Methanol der Firma Merck Deutschland hergestellt.

D,L-Homocystein und D,L-Cystathionin wurden von der Firma Sigma-Aldrich Deutschland eingesetzt..

Die folgenden internen Standards wurden bei Campro Scientific USA sowie CDN-Isotopes Canada erworben: D,L- Homocystein 3, 3, 3, 3, 4, 4, 4,4,-D₈ (Homocystin-D₈), D,L-[2-Amino-2-Carboxyethyl] Homocystein 3,3,4,4-D₄ (Cys-D₄), N,N-Dimethyl-D₃-glycin und Methionin-3, 3, 4, 4-D₄.

Das Reduktionsmittel Dithiothreitol wurde von der Firma Merck Deutschland hergestellt. Das Anionenaustauscherharz AG-MP 1 wurde von Bio Rad Deutschland bezogen.

Derivatisierung

Die Derivatisierung wurde durchgeführt mit N-methyl-N(tert-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamid von Macherey-Nagel Deutschland und Acetonitril oder Ethylacetat der Firma Merck.

4.1.2 Geräte

Autosampler	Hewlett-Packard 7683 Series
EDV	Hewlett-Packard Kajak 5 – PC, MS-ChemStation Software
Gaschromatograph	Hewlett-Packard GC 6890 Series
Gaschromatographiesäule	Hewlett-Packard-5 MS
Inkubator	Techne Dri-Block DB 3D
Massenspektrometer	Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector
Probenkühlung	Umwälzthermostat Julabo F 12

Vakuumzentrifuge	Eppendorf Concentrator 5301
Vortexer	Heidolph Reax top
Zentrifuge	Hettich Universal 30 RF

4.2 Methoden

4.2.1 Probengewinnung

Die Patientenproben stammten von unter verschiedenen Osteoporosetherapien stehenden Patienten.

Die Patienten wurden gebeten nüchtern, das heißt nach 8-stündiger Nahrungskarenz, zur Blutentnahme zu erscheinen, da über die Nahrung zugeführtes Methionin die Ergebnisse verfälschen kann. Das Blut wurde in 10 ml Sarstedt-Serummonovetten abgenommen und im Labor innerhalb von 30 Minuten bei 4°C und 1500 g für 30 Minuten zentrifugiert. Diese rasche Vorgehensweise ist unbedingt erforderlich, da die Erythrozyten auch nach der Blutabnahme HC produzieren.

Im Anschluss daran wurde das Serum abgezogen und in 2 ml Sarstedt-Tubes bei 80°C gefroren.

4.2.2 Probenvorbereitung

Nach folgenden Schritten wurde die Probenvorbereitung durchgeführt:

Zunächst wurden die jeweiligen internen Standards und Wasser zu der Serumprobe in ein 1,5 ml Vial von Varian-Chrompack Deutschland gegeben.

Zur HC-Messung erfolgte die Zugabe von Dithiothreitol, welches ein Reduktionsmittel darstellt, um HC aus seiner Bindung an Proteine und aus Disulfidbindungen zu lösen. Somit war die Bestimmung des Gesamt-HC möglich.

Mittels eines Anionenaustauschers erfolgte die Trennung der Substanzen von der Serummatrix auf einer Trennsäule.

Die Elution von der Säule erfolgte in ein 1,5 ml Vial, anschließend Trocknung in der Vakuumzentrifuge.

Im Anschluss daran erfolgte nach vollständiger Trocknung die Derivatisierung. Hierbei wurde N-methyl-N(tert-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamid (MTBSFA) zugegeben und das Gemisch wurde bei 90°C im verschlossenen Vial inkubiert. Dabei erfolgte die Bindung eines

t-butyldimethylsilyl-Restes an die OH-, SH- und NH₂- Gruppen der nachzuweisenden Verbindungen. Damit wird eine Maskierung der reaktiven Hydroxyl-, Sulfhydryl- und Aminogruppen mit der Folge der Stabilisierung der Substanz bei der Überführung in den gasförmigen Zustand erreicht. Zudem wird damit eine Hydrophobierung erreicht, so dass die Verbindungen besser getrennt werden können.

Das Anionenaustauscher-Harz wurde vor der Verwendung mit 1 N HCl gewaschen und dann mit Methanol gespült. Dadurch sollte eine Aktivierung der stationären Phase und eine Reinigung erzielt werden. Anschließend erfolgte die Trocknung des Anionenaustauscher-Harzes bei 60°C.

Von diesem Harz wurden für eine Trennsäule jeweils 100 mg eingewogen.

Unmittelbar vor Aufgabe der vorbereiteten Serumprobe wurde die Säule zunächst mit 1 ml Methanol und im Anschluss daran mit 3 ml Aqua destillata gewaschen.

4.2.2.1 Probenvorbereitung zur Messung von Homocystein, Cystathionin, Dimethylglycin und Methionin

Zunächst erfolgte die Herstellung der internen Standards. Es wurden 50 µl Wasser, welches 19,99 nmol Homocystein-D₈ enthielt, und 50 µl Wasser mit 377,6 pmol Cystathionin-D₄, gemischt.

Zur Probenvorbereitung wurden in ein 2 ml Schraubvial nacheinander 275 µl Standard, 400 µl Serum, 50 µl Dithiothreitol-Lösung und 800 µl Aqua destillata pipettiert. Im Folgenden wurde die Lösung gut gevortext und für 30 Minuten bei 40°C inkubiert. Anschließend wurden die inkubierten Proben mit einer Glaspipette auf die mit 1 ml Methanol und 3 ml Aqua destillata gewaschene Trennsäule gegeben. Danach wurde die Säule 3mal mit 3 ml Aqua destillata und 1mal mit 3 ml Methanol gespült. Darauf folgend wurde die Säule in 1,5 ml Vials mit 1,1 ml 0,4 N Essigsäure in Methanol eluiert. Das Eluat wurde nun 60 Minuten bei 45°C in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Dann wurde die Derivatisierungslösung wie folgt hergestellt: Zu 400 µl hochreinem Ethylacetat wurden 200 µl MTBSFA gegeben. In jedes Vial wurden nun 30 µl dieser Derivatisierungslösung pipettiert. Die fest verschlossenen Vials wurden gut gevortext. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 90°C.

4.2.3 Messmethodik

4.2.3.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie ist eine Verteilungschromatographie, die als Analysemethode zum Auftrennen von Gemischen in einzelne chemische Verbindungen weite Verwendung findet. Die Gaschromatographie ist nur anwendbar für Komponenten, die gasförmig sind oder sich verdampfen lassen. Bei dieser Art der Chromatographie wird als mobile Phase ein Inertgas verwendet, meist Stickstoff, Helium oder Wasserstoff. Das Trägergas wird durch eine Röhre beziehungsweise Kapillare mit einem definierten Innendurchmesser, die so genannte Säule, gedrückt. Die Säule besteht entweder aus Metall oder aus einem zur Erhöhung der Bruchsicherheit beschichteten Quarzglas. Sie wird innen mit einer definierten stationären Phase ausgekleidet, häufig mit zähflüssigen Polyorganosiloxanen. Die chromatographische Auftrennung eines Stoffgemisches in einem Gaschromatographen erfolgt im einfachsten Falle ausschließlich aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte der Einzelsubstanzen in dem Gemisch, wobei keine spezielle Wechselwirkung mit der stationären Phase, sondern nur eine zehntausendfach wiederholte Verteilung erfolgt. In vielen Fällen wird aber gezielt eine spezielle Wechselwirkung des zu analysierenden Stoffes mit der stationären Phase genutzt, um Substanzen besser trennen zu können. Die Stärke der Wechselwirkungen zwischen den Probenkomponenten und der stationären Phase wird sowohl von deren Struktur als auch von deren funktionellen Gruppen bestimmt. Eine Grundbedingung für die Gaschromatographie ist, dass sich der Stoff, den man untersuchen möchte, unzersetzt verdampfen lässt, sofern er nicht schon gasförmig vorliegt. Mittels Derivatisierung lassen sich der Gaschromatographie ansonsten schwer zugängliche Analyten soweit thermisch stabilisieren, dass sie ohne Schwierigkeiten zwischen den Phasen aufgetrennt werden können.

Bei der Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung dient der Gaschromatograph zur Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches und das Massenspektrometer zur Identifizierung und gegebenenfalls auch Quantifizierung der einzelnen Komponenten.

Die Säulen werden im temperierbaren sogenannten Ofenraum von den inerten Trägergasen als mobiler Phase durchströmt. In diesen Gasstrom wird über den beheizbaren Injektor das verdampfte Stoffgemisch injiziert. Jede Komponente des Gemisches hat durch seine physiko-chemischen Eigenschaften eine charakteristische Mobilität in der Trennsäule, die unter anderem vom Verteilungskoeffizienten zwischen stationärer und mobiler Phase bestimmt

wird. So können auch sehr komplexe Stoffgemische in ihre Komponenten aufgetrennt werden.

Nach Durchlaufen der Chromatographiesäule werden die getrennten Stoffe in einem Vakuum ionisiert. Durch die Ionisierung werden die Moleküle der Einzelsubstanz entweder zertrümmert oder protoniert.

Die Auftrennung dieser Molekülfragmente erfolgt anschließend in einem elektromagnetischen Feld des sogenannten Quadrupols. Das Quadrupol-Massenspektrometer ist ein Partialdruckmessgerät für das Hochvakuum. Elektronen, welche beschleunigt wurden, stoßen mit den Molekülen des Probengases zusammen und ionisieren diese dabei. Die erzeugten Ionen werden durch ein statisches, elektrisches Feld beschleunigt und passieren zentral vier parallel liegenden Stabelektroden, deren Schnittpunkte mit einer Ebene senkrecht zur Zylinderachse ein Quadrat bilden (Quadrupol). Es findet eine Selektierung statt, so dass jeweils nur Teilchen mit einer definierten Masse das Feld durchlaufen können.

Bei der Massenspektrometrie wird das Verhältnis Masse-zu-Ladung (m/q) der Teilchen gemessen. Bei bekannter Ladung q kann daraus die Masse m der Teilchen ermittelt werden. Zudem können Aussagen über das Vorhandensein von Teilchen mit bekanntem Masse-zu-Ladung-Verhältnis getroffen werden. Der Multiplier, als eigentlicher Detektor, kann das zeitlich unterschiedliche Auftreffen dieser Massen bestimmter Ladungen über geringste Spannungsänderungen, die durch Verstärkung im sogenannten Sekundärelektronenvervielfacher in verwertbare Signale umgewandelt werden, messen. Somit besteht der ermittelte Peak aus einer Summe der zu einer bestimmten Zeit am Multiplier auftreffenden Massen.

4.2.3.2 Konstante Isotopen-Verhältnisbestimmung

Die Analysemethode ermittelt das Verhältnis der Menge der unmarkierten, endogenen Substanz unbekannter Konzentration zu einem, meist mit Deuterium-markiertem, internen Standard bekannter Konzentration. Deuterium ist neben Protium und Tritium ein Isotop des Wasserstoffs. Es wird aufgrund seiner Masse auch als „schwerer Wasserstoff“ bezeichnet.

Die internen Standards dieser Methode sind den zu bestimmenden Analyten chemisch gleiche Verbindungen, die sich nur durch das Vorhandensein von Deuteriumatomen im Molekül unterscheiden. Sie erscheinen deswegen zur nahezu gleichen Retentionszeit

(aufgrund des schwereren Deuteriums eluieren die deuterierten Verbindungen etwa 1/10 s früher), was eine getrennte Detektion in der Massenspektrometrie mittels single ion mode

(SIM) ermöglicht, da ein H-Atom mit der relativen Atommasse von 1 durch ein Deuterium-Atom mit der relativen Atommasse 2 ersetzt ist. Abhängig von der Zahl der Deuteriumatome im Molekül ergibt sich eine Massendifferenz zwischen endogener Substanz und Standard um jeweils 1 pro Deuterium-Atom nur an den Massenbruchstücken, die Deuterium enthalten. Anhand der integrierten Flächen der Peaks solcher Massen kann die Konzentrationsbestimmung erfolgen. Dafür werden stabile Fragmente charakteristischer Massen herangezogen (sog. target ions), die eine hohe Spezifität für das zu messende Agens besitzen und mit einer vergleichsweise hohen Intensität (abundance) nachweisbar sind. Die Kenntnis und das Vorhandensein der Target-Ionen erlaubt eine massenspektrometrische Messung im SIM-Modus, bei dem nur vorher festgelegte Massen detektiert werden. Diese Methode bietet sowohl eine um bis zu 10fach gesteigerte Sensitivität als auch exakter zu quantifizierende Peaks gegenüber der Messung im Scan-Mode (TIC= total ion chromatogram), bei der alle auftreffenden Massen detektiert werden und Interferenzen der einzelnen Massen auftreten. Ein Nachteil der SIM-Methode besteht darin, dass der Detektor für die meisten Massen „blind“ ist, was die Erkennung von Masseninterferenzen beziehungsweise Coelutionen erschwert. Deswegen werden neben den Target-Ionen die sogenannten Qualifier-Ionen detektiert. Dies sind stabile Massen ähnlich hoher Spezifität, doch in den meisten Fällen geringerer Intensität. Sie treten entsprechend dem Massenspektrum der Reinsubstanz in einer bestimmten relativen Peakhöhe zum Target-Ion auf und charakterisieren dadurch die Verbindung. Ihre Mitbestimmung im SIM kann daher helfen, grobe Messfehler zu verhindern. Die Angabe dieses Markers der Analysenqualität erfolgt in Prozent des relativen, bei der Reinsubstanz vorliegenden Verhältnisses von Target und Qualifier als sog. Q-Value und dient somit der Überprüfung der Reinheit der Fragmente. Durch die Zugabe des internen Standards werden Fehler der Probenvorbereitung und Messung minimiert, da das gleiche Verhalten von Standard und in der Probe enthaltener Substanz ein konstantes Verhältnis der Verbindungen gewährleistet. Dieses wird gemessen. Zur Konzentrationsbestimmung multipliziert man den Quotienten (Response) des Verhältnisses der Flächen unter der Kurve (AUC = area under curve) der Target-Ionen von unmarkiertem (endogenem) zu markiertem Metabolit (interner Standard) mit der im Serum vorliegenden Konzentration des internen Standards.

$$\text{Response} = \frac{\text{AUC [target-ion}_{\text{endogene Substanz}}] }{\text{AUC [target-ion}_{\text{interner Standard}}] }$$

Die Serummengen betrugen 400 µl.

Die Berechnung der Konzentrationen anhand der angegebenen Berechnungsformel erfolgte mit Hilfe der Hewlett-Packard MS-ChemStation Software.

4.2.4 Messparameter

Für die Bestimmung der verschiedenen Metabolite wurde dieselbe Trennsäule verwendet, Helium diente hier als Trägergas. Die Messbedingungen unterschieden sich jedoch.

Die Probeninjektion auf die Säule erfolgte durch einen mit einer 10 µl Haemilton-Spritze ausgestatteten Autosampler. Diese Autosampler erlaubten die sequenzielle Abarbeitung einer Vielzahl an Proben. Die Serumproben wurden ohne Probenverdünnung mit einem Volumen von 1 µl in den Injektor gegeben (Splitless-Modus). Die Helium-Zufuhr als Trägergas erfolgte gepulst, mit einem Pulsdruck von 30 psi und einer zeitlichen Verzögerung von 1,5 Minuten, um eine gute Fokussierung auf der Säule zu erzielen. Reinsubstanzen in höheren Konzentrationen als den Serumkonzentrationen können durch ein Trägergas im Injektor mit Verdünnung des injizierten Volumens (Split-Modus) auf die Säule gegeben werden. So wird eine Verschmutzung und Überladung der Säule vermieden. Die Splitless-Injektion bietet den Vorteil einer erhöhten Sensitivität, wie sie zum Beispiel bei der Messung von niedrigen Serumkonzentrationen von Cystathionin nötig ist. In kürzeren Abständen wurden spezielle, mit Glaswolle gefüllten, Fokus-Liner ausgetauscht, um eine rasche Verunreinigung der Säule zu vermeiden. Bei der Messung der Serumproben wurde nach jeweils vier Injektionen ein Konditionierungszyklus über den Temperaturbereich von 60 – 300°C mit der Injektion des jeweiligen Lösungsmittels zwischengeschaltet, um die Säule zu reinigen.

Die Temperatur am Injektor betrug 250°C, der Säulendruck lag bei 5,94 psi, der initiale Säulenfluss betrug 28,3 ml/min. Die Transferstrecke vom Säulenende zum Massenspektrometer hatte eine Temperatur von 320°C. Die Temperatur des Quadrupol-Massenspektrometer lag bei 250°C.

4.2.4.1 Messung von Homocystein, Dimethylglycin, Methionin und Cystathionin

Zu Beginn hatte die Säule 1 min. eine Temperatur von 60°C, anschließend wurde die Temperatur mit 15°C pro Minute auf eine Endtemperatur von 300°C erhöht. Um die Reinigung der Säule zu bewirken, war es nötig, die Temperatur bei 300°C für 5 Minuten zu belassen. Die Massendetektion im SIM erfolgte nach 12,45 min für endogenes HC mit den

detektierten Massen m/z 420 (Target) und m/z 392 (Qualifier) und 1/10 s früher für markiertes HC mit den detektierten Massen m/z 424 (Target) und m/z 396 (Qualifier).

Die Massendetektion für endogenes DMG erfolgte nach 5,62 min mit den detektierten Massen m/z 160 (Target) und m/z 202 (Qualifier), deuteriertes DMG etwa 2/10 s früher mit den Massen m/z 166 (Target) und m/z 208 (Qualifier).

Nach 10,85 min wurde endogenes Met mit seinen charakteristischen Massen m/z 320 (Target) und m/z 292 (Qualifier) detektiert, das deuterisierte Met wurde etwa 1/10 s früher detektiert mit den Massen m/z 324 (Target) und m/z 296 (Qualifier).

Endogenes Cys wurde mit den charakteristischen Massen m/z 362 (Target) und m/z 621 (Qualifier) nach 16,46 min detektiert, deuteriertes Cys wurde etwa 2/10 s früher detektiert mit den Massen m/z 366 (Target) und m/z 625 (Qualifier).

Vor der Elutionszeit von Cys wurde die Multiplierspannung am Massenspektrometer von etwa 1250 Volt auf 1350 Volt erhöht. Dies hatte zum Ziel, eine höhere Sensitivität und eine bessere Quantifizierbarkeit zu erreichen. Die angegebenen Retentionszeiten waren als Richtwerte zu verstehen, welche sich im Verlauf ändern konnten. So zum Beispiel bei Verwendung einer neuen Säule oder um aufgetretene Verschmutzungen zu vermindern, bei Kürzung des Säulenansatzes. Da jede Säule herstellungsbedingte Unterschiede in Polarität und Phase aufweist, konnte eine Detektion von sauberen Peaks durch Veränderung der Ramp und isothermer Zwischenschritte erzielt werden.

4.3 Entwicklung und Evaluierung der Methodik

Die Entwicklung und Evaluierung der Messmethodik wurde an der Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-Schiller Universität Jena durchgeführt. Hierbei konnte eine Methode zur exakten, quantitativen Bestimmung von Homocystein, Methionin und der Metabolite Dimethylglycin und Cystathionin etabliert werden [13], so dass in diesem Falle Zusammenhänge zwischen Homocystein und weiterer bedeutsamer Metabolite im HC-Stoffwechsel, dem Vitaminhaushalt der Vitamine Folsäure, B6 und B12 und der klinischen Daten der Osteoporose untersucht werden konnten.

4.4 Anwendung der Messmethodik

4.4.1 Bestimmung an Osteoporose-Patienten

Alle Metabolite wurden zur Bestimmung der pathologischen Konzentrationen bei 111 Patienten, welche an einer Osteoporose litten, bestimmt. Andere vorbestehende Erkrankungen stellten kein Ausschlusskriterium dar. Die Osteoporose war bei den 86 weiblichen und 25 männlichen Patienten mittels Osteodensitometrie gesichert.

Das Durchschnittsalter lag bei 65 (36-85) Jahren.

4.5 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 17.0 (SPSS Inc. USA) durchgeführt. Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgte als Mittelwerte, während als Streumaße die Standardabweichungen gewählt wurden.

4.5.1 Präzision

Die Präzision beschreibt die Zuverlässigkeit der Versuchsergebnisse. Der Mittelwert ist empfindlich gegenüber außergewöhnlichen Werten und ist nur dann anwendbar, wenn die ermittelte Häufigkeitsverteilung der Daten nur einen Gipfel aufweist. Die Variabilität der Werte kann durch die Standardabweichung (σ) charakterisiert werden. Der Variationskoeffizient ist definiert als die relative Standardabweichung und wird in Prozent angegeben. Der Median ist ein Maß für die Lage des Zentrums (Mittels) der Häufigkeitsverteilung. Die oben genannten Werte wurden zur Auswertung der Daten herangezogen bzw. berechnet.

4.5.2 Kolmogorov-Smirnov-Test

Die kontinuierlichen Variablen wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Während einige der getesteten Variablen keine Normalverteilung aufwiesen (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p < 0,05$), konnte für andere Variablen eine Normalverteilung berechnet werden (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p \geq 0,05$). Bei den Vergleichen der Stichproben wurden daher Tests für normalverteilte Stichproben und nichtparametrische Tests für nicht normalverteilte Stichproben herangezogen.

4.5.3 t-Test und Levene-Test

Bei dem Vergleich von 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben wurde der t-Test verwendet. Der t-Test setzt neben der Normalverteilung außerdem die Gleichheit der Varianzen in den betrachteten Populationen voraus. Vorher wurde zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen der Levene-Test durchgeführt. Aufgrund der nachgewiesenen Varianzen wurde der Student t-Test angewendet.

4.5.4 Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test wurde bei nicht normalverteilten Stichproben als nichtparametrisches Verfahren angewendet.

4.5.5 Chi-Quadrat-Test und exakter Test nach Fisher

Die kategorisierten Daten dagegen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests bzw. des exakten Tests nach Fisher ausgewertet. Der Chi-Quadrat-Test darf nur ausgeführt werden, wenn alle erwarteten Zell-Häufigkeiten > 5 sind; wird diese Bedingung nicht eingehalten, prüft man die Hypothesen mit dem exakten Test nach Fischer.

Bei der Verwendung des Chi-Quadrat-Tests wurden die erforderlichen Testvoraussetzungen erfüllt, so dass bei allen Tests weniger als 20% der erwarteten Häufigkeit kleiner 5 war.

4.5.6 Zweiseitige Signifikanzüberprüfung

Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde.

4.5.7 Multivariate Analyse

Zur multivariante Analyse wurde die binäre logistische Regression mit Vorwärtseinschluss unter Verwendung des Likelihood-Ratio-Kriteriums (Einschluss p-Wert $\leq 0,05$, Ausschluss p-Wert $> 0,1$) durchgeführt. Mit dem Verfahren der binären logistischen Regression wird die Abhängigkeit einer dichotomen Variablen von anderen unabhängigen Variablen, die ein beliebiges Skalenniveau haben können, untersucht.

4.5.8 Graphische Darstellungen

Die graphischen Darstellungen wurden ebenfalls mit SPSS erstellt.

4.5.8.1 Fehlerbalken

Zur Veranschaulichung der Mittelwerte wurden bei normalverteilten Stichproben Fehlerbalken verwendet, wobei als Streumaß aufgrund der großen Streubreite die Standardfehler aufgeführt wurden.

4.5.8.2 Box-Plot

Zur Veranschaulichung der Mediane und Quartilsabstände bei nicht normalverteilten Stichproben wurden Boxplots verwendet. Während in den Boxen der Median sowie die 25. – 75. Perzentile aufgetragen sind, entsprechen die T-Balken dem kleinsten und größten Wert, sofern diese keine Ausreißer bzw. Extremwerte sind. Die Ausreißer sind dabei Werte, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen außerhalb der Box liegen und sind in den Graphiken als Kreise dargestellt, während Extremwerte, welche mehr als 3 Boxlängen außerhalb der Box gemessen wurden, als Kreuzchen aufgetragen sind.

4.5.8.3. Balkendiagramme

Die kategorisierten Daten wurden graphisch mit Hilfe von einfachen und gruppierten Balkendiagrammen dargestellt.

5. Ergebnisse

5.1 Retentionszeiten

5.1.1 Homocystein

Beim HC konnte ein einzelner Peak nach 12,45 min detektiert werden, wenn eine Homocystein-Lösung im Scan-Modus gemessen wurde.

Die Absolutmenge besteht aus der Summe der zu einer bestimmten Zeit am Multiplier auftretenden Massen und wird als Intensität bzw. Häufigkeit (=abundance) angegeben.

Die Chromatogramme sind Originaldaten der Hewlett-Packard MS ChemStation® Software.

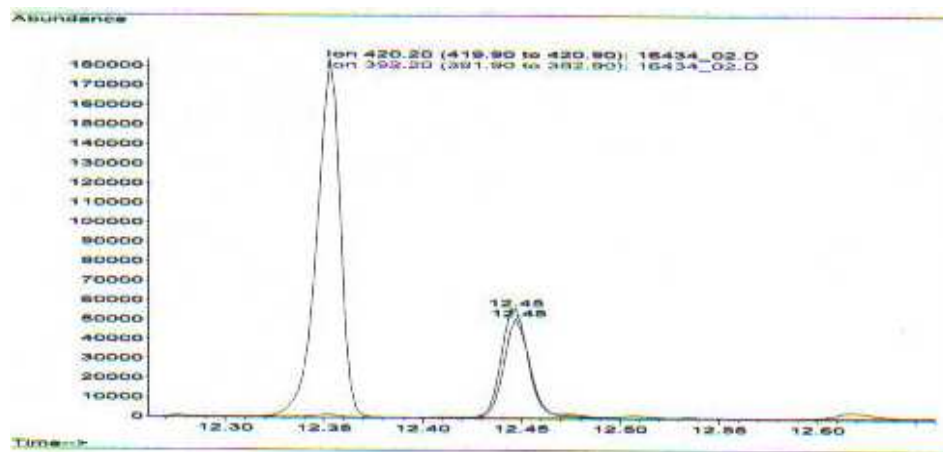


Abbildung 3: Chromatogramm von HC

In der folgenden Abbildung 4 wird der bei mit einem Peak nach 12,44 min nahezu gleicher Retentionszeit detektierte interne Standard von HC-D₄ gezeigt.

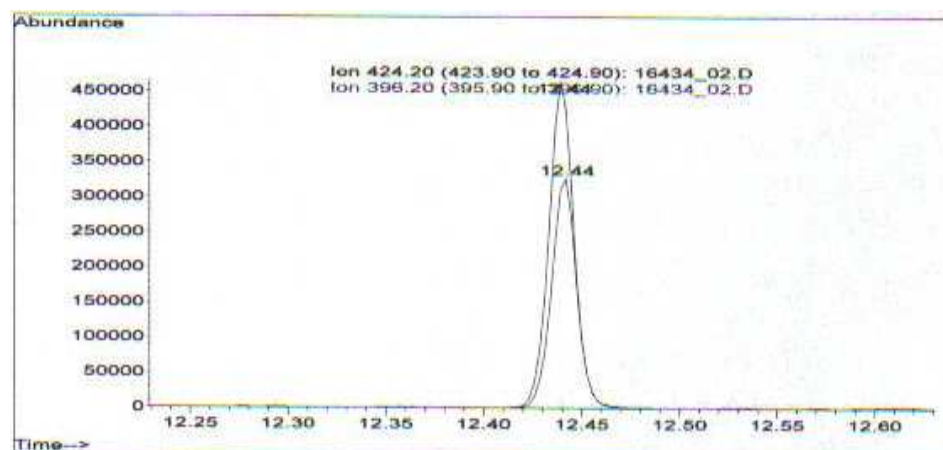


Abbildung 4: Chromatogramm von HC-D₄

5.1.2 Cystathionin

Das Cys wurde unter den bereits beschriebenen Messbedingungen nach 16,46 min eluiert.

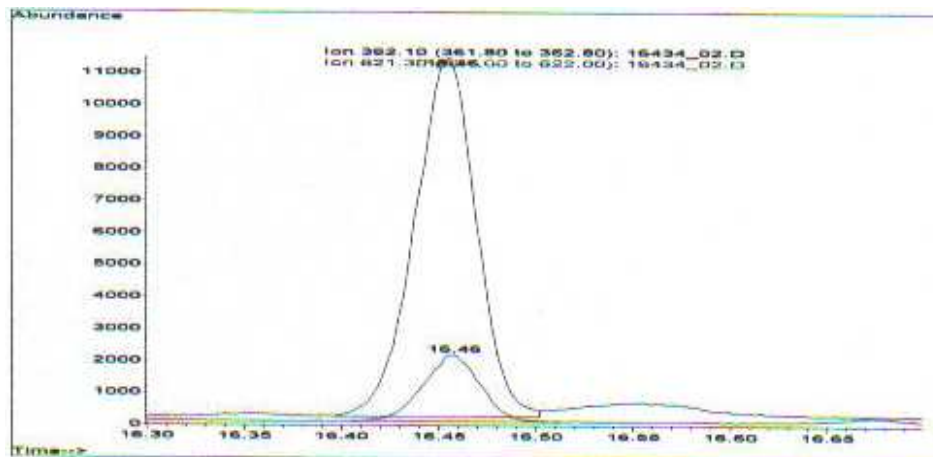


Abbildung 5: Chromatogramm von Cys

In der folgenden Abbildung 6 wird gezeigt, dass der interne Standard von Cys-D₄ nach 16,44 min eluiert wurde.

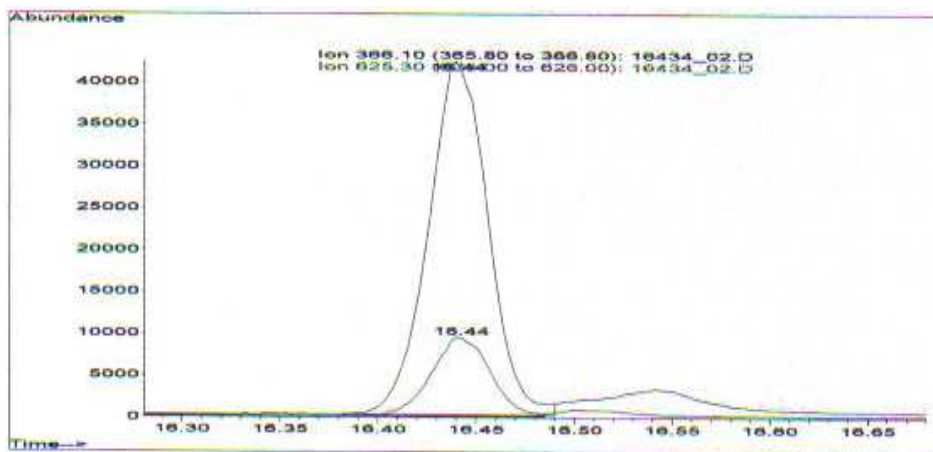


Abbildung 6: Chromatogramm von Cys-D₄

5.1.3 Dimethylglycin

Das endogene DMG wurde nach 5,62 min eluiert. In Abb. 7 findet sich ein typischer Peak.

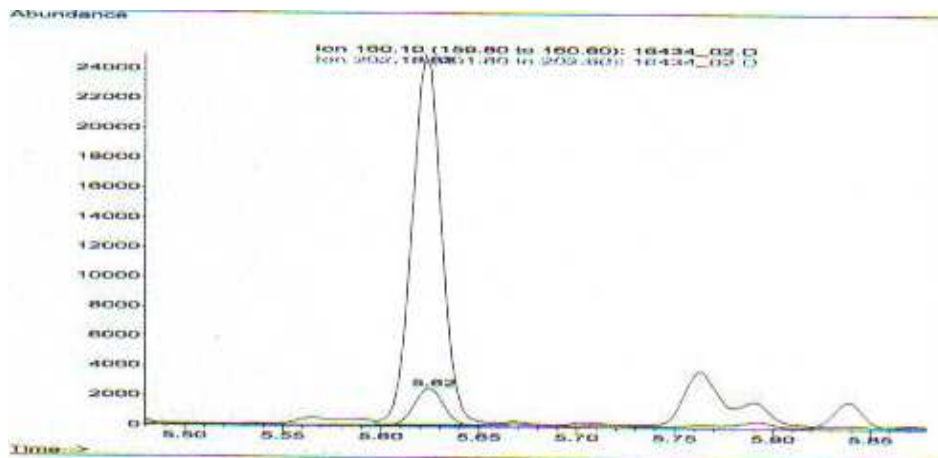


Abbildung 7: Chromatogramm von DMG

In der folgenden Abbildung wird gezeigt, dass das derivatisierte DMG-D₆ nach 5,60 min, also 2/10 s früher als das endogene DMG eluiert wurde.

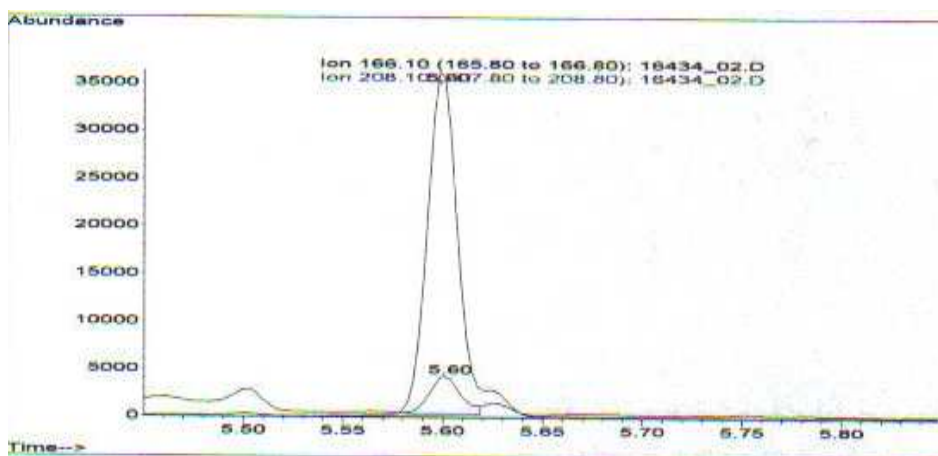


Abbildung 8: Chromatogramm von DMG-D₆

5.1.4 Methionin

Met wurde unter den in 4.2.4.1 beschriebenen Bedingungen nach 10,85 min eluiert und wird in der folgenden Abbildung 9 gezeigt.

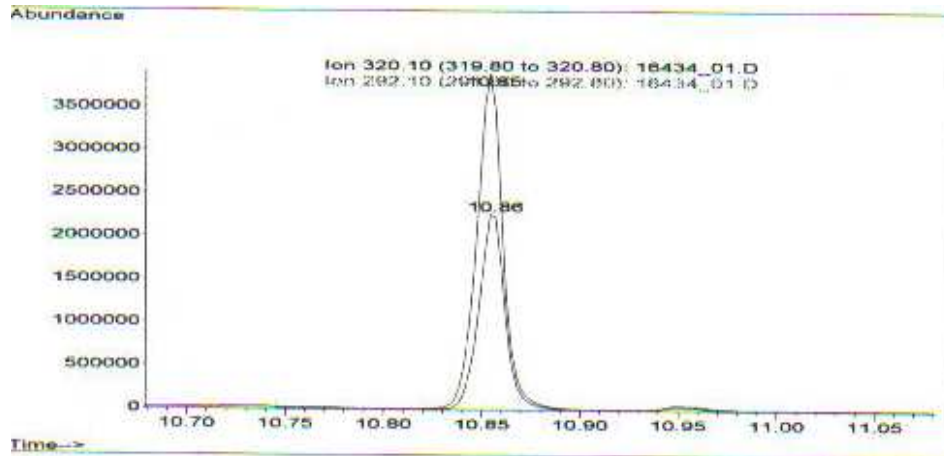


Abbildung 9: Chromatogramm von Met

In der sich nun anschließenden Abbildung findet sich ein typischer Peak des Met-D₄ nach 10,84 min und wurde somit 1/10 s früher eluiert als das Met.

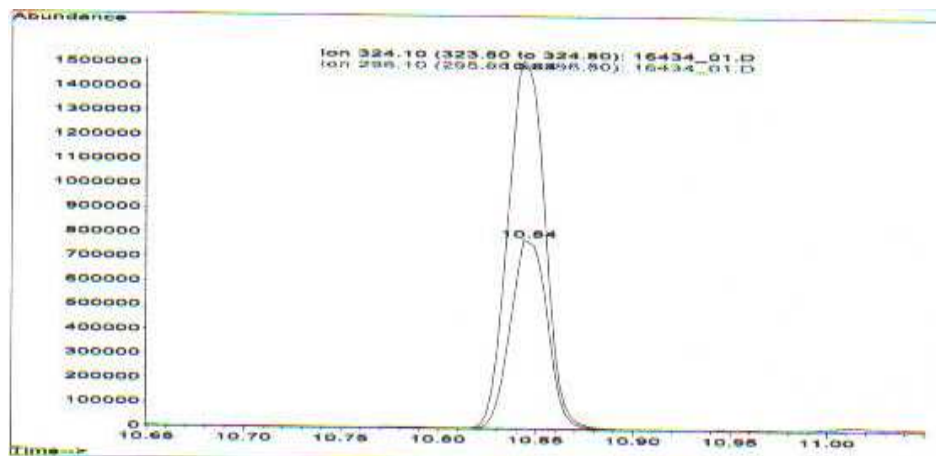


Abbildung 10: Chromatogramm von Met-D₄

5.2 Basisparameter

5.2.1 Geschlecht

An der Studie hatten 111 Patienten teilgenommen, welche nach WHO-Kriterien an einer Osteoporose litten. Hierbei handelte es sich um 86 weibliche und 25 männliche Patienten.

In der folgenden Abbildung wird das Auftreten eines Frakturereignisses bei weiblichen und männlichen Osteoporose-Patienten dargestellt.

Von den 84 Patienten weiblichen Geschlechts hatten 43 bereits eine Fraktur erlitten, 41 Patientinnen hatten anamnestisch kein Frakturereignis.

In der Gruppe der männlichen Probanden lag bei 11 Patienten in der Krankheitsanamnese eine Fraktur vor, bei 13 Patienten nicht.

Insgesamt konnte im Verlauf bei 54 Probanden eine Fraktur festgestellt werden, bei 54 Probanden war die Anamnese hinsichtlich dieses Parameters negativ.

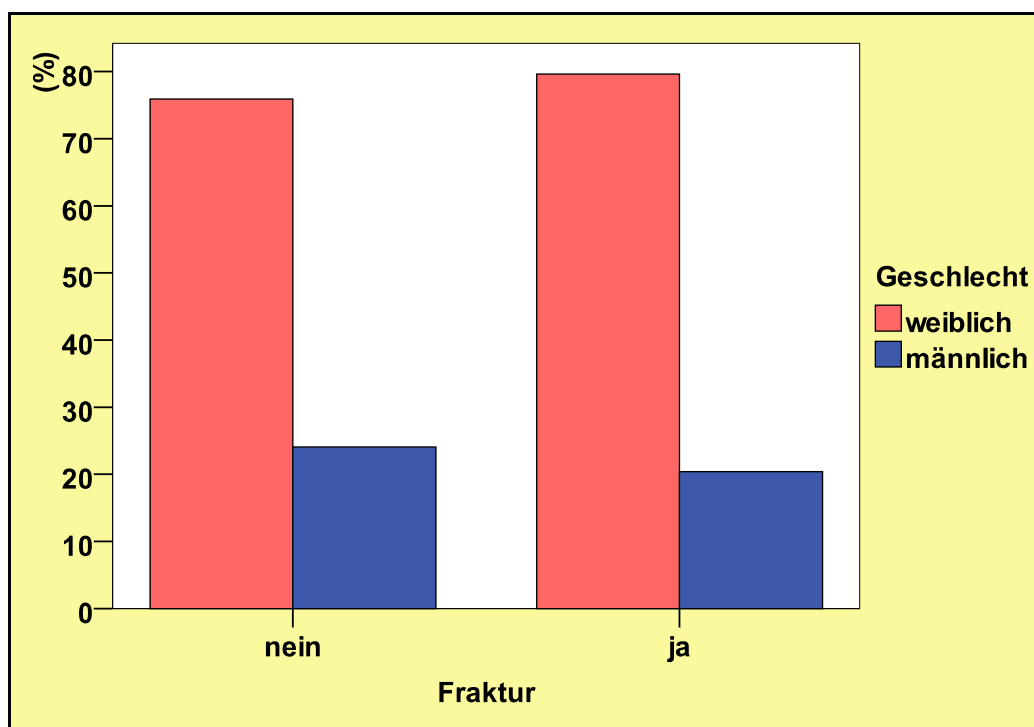


Abb. 11: Geschlecht und Fraktur

5.2.2 Alter (Jahre)

Das Durchschnittsalter der Probanden betrug 64,9 (36 – 85) Jahre, mit einem Median von 67 Jahren und einer Standardabweichung von 9,67.

In der folgenden Abbildung ist das Alter nahezu normalverteilt in einer Glockenkurve dargestellt. Während die älteren Probanden an einer primären Osteoporose Typ I oder Typ II (Typ I: postmenopausale Osteoporose 66 Patientinnen, Typ II: senile Osteoporose 23 Patienten) litten, zeigte sich bei jüngeren Patienten eine sekundäre Osteoporose. Hier erkrankten 13 Patienten nach Steroidtherapie, 4 Probanden aufgrund einer Hyperthyreose, 3 Probanden wegen eines Hyperparathyreoidismus und jeweils 1 Patient aufgrund eines Androgenmangels bzw. nach Gastrektomie bei Magenkarzinom an einer sekundären Osteoporose.

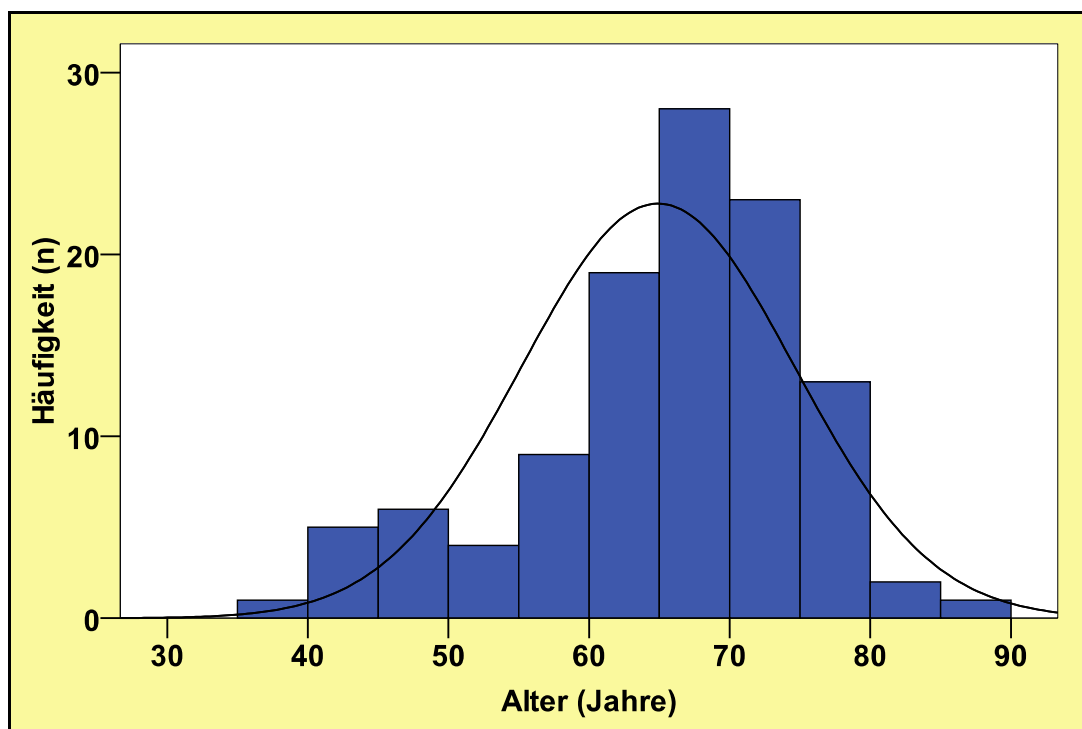


Abb. 12: Altersverteilung

5.2.2.1 Altersabhängigkeit bei Homocystein

93 der 110 Patienten zeigten einen normalen HC-Spiegel, bei 17 Patienten konnte mit einem Wert $> 14,6 \mu\text{mol/l}$ (Referenzbereiche siehe Kapitel 1.9) ein erhöhtes HC, nachgewiesen werden. Die folgende Tabelle zeigt die Mittelwerte und Mediane des Lebensalters der Probanden.

Tab. 1: Alter (Jahre) bei Homocystein

Homocystein	Mittelwert	Standard-abweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Median	N
nicht erhöht	64,17	9,596	,995	66,00	93
Erhöht	68,82	9,678	2,347	71,00	17
Insgesamt	64,89	9,712	,926	67,00	110

5.2.3 Homocystein-Werte

Der Mittelwert des HC lag bei $9,13 \mu\text{mol/l}$, der Medianwert bei $9,25 \mu\text{mol/l}$. Die Standardabweichung als Maß für die Streuung der Werte um ihren Mittelwert betrug 5,57. Der kleinste HC-Wert lag bei $0,32 \mu\text{mol/l}$, der größte bei $26,51 \mu\text{mol/l}$.

Die folgende Tabelle bietet einen Überblick über die ermittelten Häufigkeiten eines erhöhten und nicht erhöhten HC.

Tab 2: Homocystein-Werte

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
nicht erhöht	93	83,8	84,5
Erhöht	17	15,3	15,5
Gesamt	110	99,1	100,0
Fehlend	1	,9	
Gesamt	111	100,0	

In der Abbildung 13 sind die Homocystein-Werte der Probanden in einer Glockenkurve dargestellt.

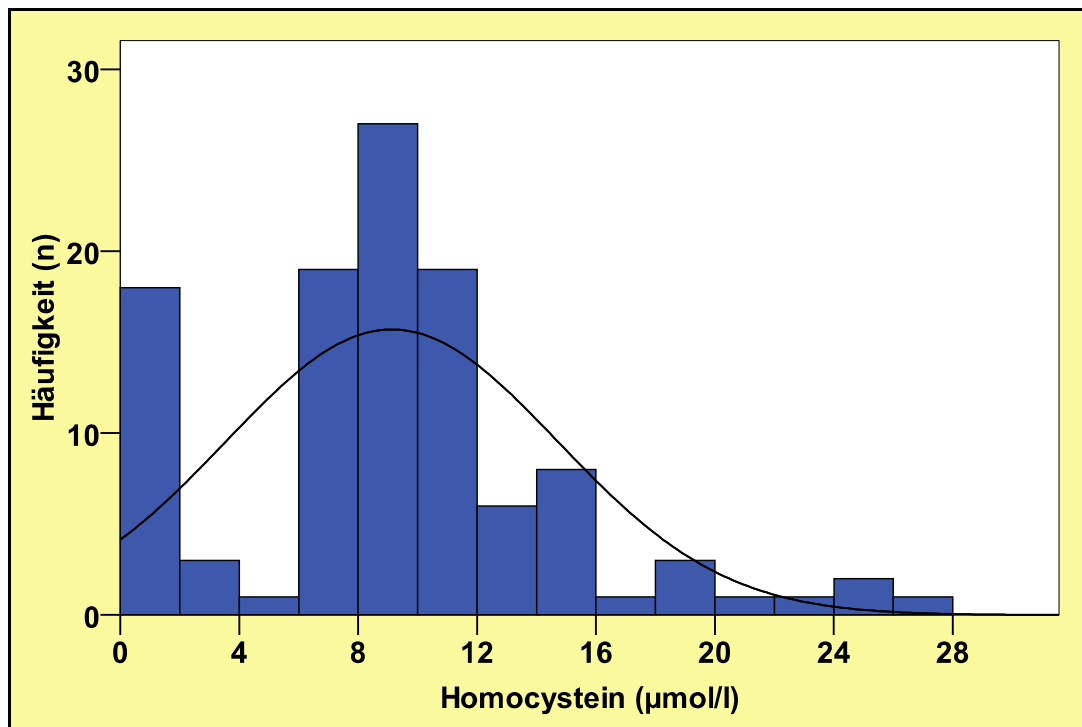


Abb. 13: Homocystein-Werte der Probanden (µmol/l)
(Glockenkurve = Normalverteilung)

5.2.4 Frakturen bei Osteoporose

Von 108 Patienten erlitten 54 Personen eine Niedrigenergiefraktur, dies konnte durch Patientenangaben bzw. Akten- und Befundstudium ermittelt werden.

Tab. 3: Fraktur bei Osteoporose

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente
Nein	54	48,6	50,0
Ja	54	48,6	50,0
Gesamt	108	97,3	100,0
Fehlend	3	2,7	
Gesamt	111	100,0	

Die Tabelle bezieht sich auf 108 Patienten, da bei 3 Fälle keine Angaben zu aufgetretenen Frakturen gemacht wurden. Bei der Angabe der gültigen Prozente sind die Prozentangaben nur auf die vorhandenen Datensätze bezogen, in der vorliegenden Tabelle also auf 108 Fälle.

5.3 Homocystein und Metabolite bei Fraktur

5.3.1 Homocystein bei Fraktur

Es war bei 107 Osteoporose-Patienten der HC-Spiegel bestimmt worden. Bei 90 dieser Patienten zeigte sich ein HC-Wert im Normalbereich, bei 17 Probanden war das HC erhöht. Bei 53 Patienten konnte eine Fraktur nachgewiesen werden, 54 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Studie noch keine Fraktur erlitten.

Für den HC-Spiegel gilt allgemein der Referenzbereich 5,4 – 14,6 $\mu\text{mol/l}$.

Ein normaler HC-Spiegel fand sich bei 41 Personen, bei welchen anamnestisch eine Fraktur aufgetreten war und bei 49 Personen, welche noch keine Fraktur erlitten hatten. Von der Patienten-Gruppe, bei der ein erhöhtes HC ermittelt worden war, war bei 12 Patienten eine Fraktur im Verlauf der Erkrankung aufgetreten, bei 5 Patienten nicht. Nach dem exakten Test nach Fischer ergibt sich eine exakte Signifikanz (2-seitig) von 0,069.

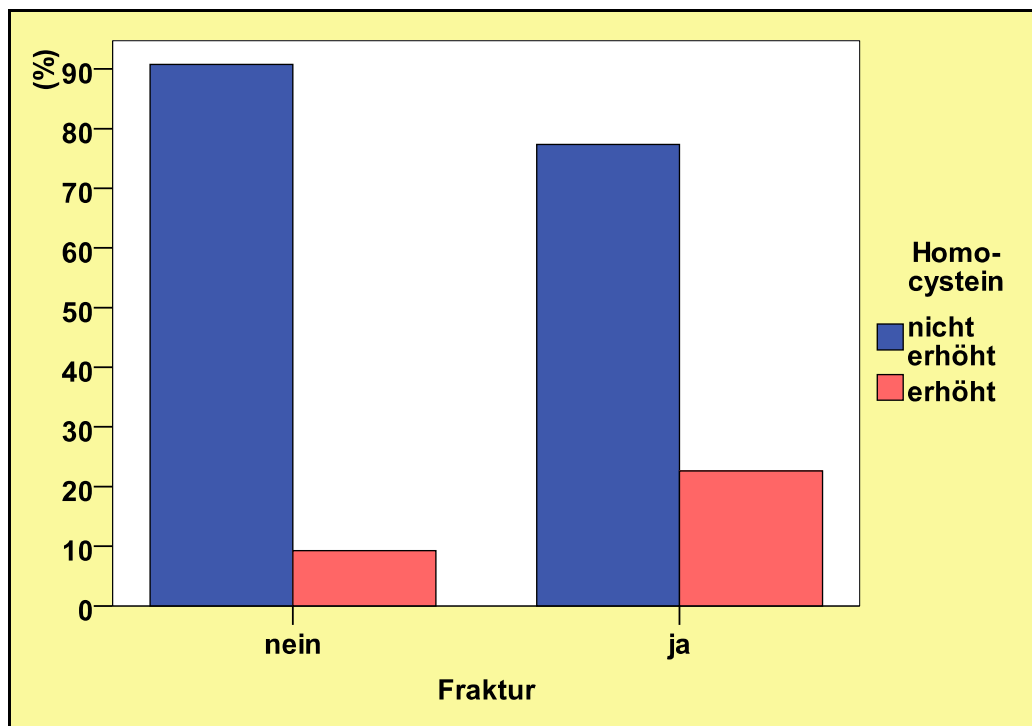


Abb. 14: Homocystein (erhöht/nicht erhöht) und Fraktur

Der Mittelwert des HC in der Probanden-Gruppe mit Fraktur betrug 10,32 $\mu\text{mol/l}$ (Standardabweichung 5,77), der Medianwert lag bei 9,42 $\mu\text{mol/l}$, während der Mittelwert des HC bei Probanden ohne Frakturereignis bei 8,01 $\mu\text{mol/l}$ (Standardabweichung 5,31) und der Median bei 9,21 $\mu\text{mol/l}$ lag. Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich für HC ($\mu\text{mol/l}$) eine asymptotische Signifikanz von 0,060.

Der folgende Boxplot der Abbildung 15 veranschaulicht die Mediane und Quartilsabstände der nicht normalverteilten Stichproben bezüglich der HC-Werte bei zuvor aufgetretener Fraktur.

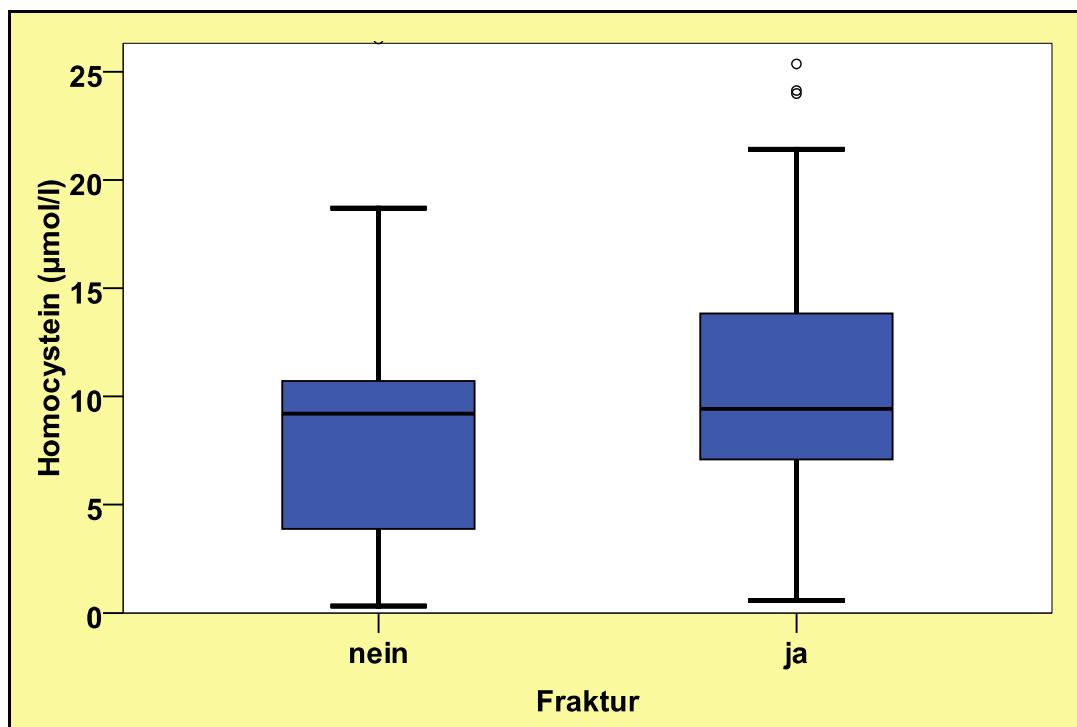


Abb. 15: Homocystein-Werte ($\mu\text{mol/l}$) bei Fraktur

In der folgenden Abbildung 16 wird mittels Balkendiagramm das Auftreten einer Fraktur bei erhöhten beziehungsweise nicht erhöhten HC-Konzentrationen im Serum dargestellt.

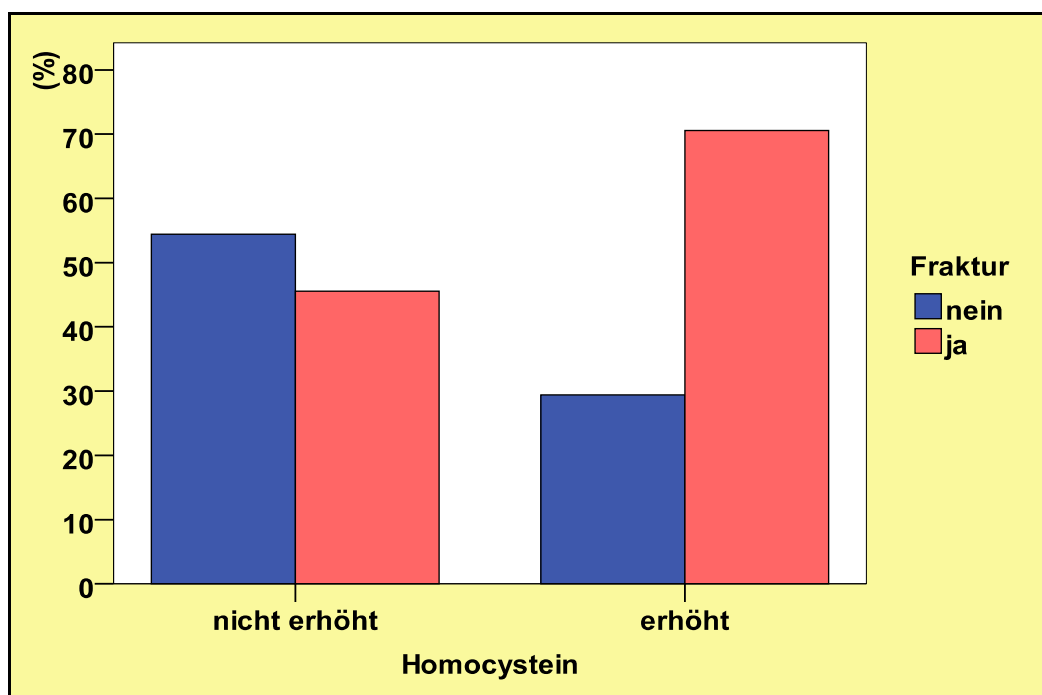


Abb. 16: Fraktur bei Homocystein

5.3.2 Cystathionin bei Fraktur

Cys entsteht mit Hilfe der CBS in einer Vitamin B6-abhängigen Reaktion aus HC und wird in nmol/l gemessen.

Der Mittelwert in der Patienten-Gruppe mit Fraktur betrug 1754,54 nmol/l (Standardabweichung 2354,14), der Median lag bei 408,38 nmol/l.

Bei den Patienten ohne Fraktur lag der Mittelwert bei 2461,79 nmol/l (Standardabweichung 2831,08) und der Median bei 521,75 nmol/l.

Der folgende Boxplot veranschaulicht die Mediane und Quartilsabstände.

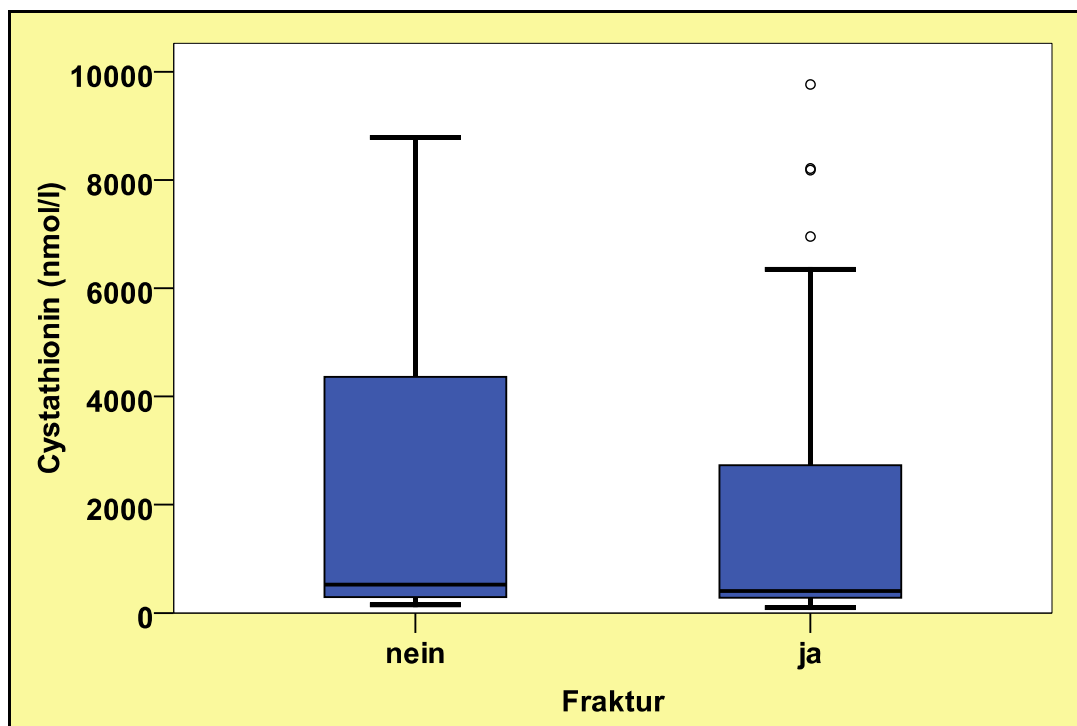


Abb. 17: Cystathionin (nmol/l) bei Fraktur

5.3.3 Dimethylglycin bei Fraktur

DMG entsteht bei der Übertragung einer Methylgruppe von Betain auf HC. Das DMG konnte bei 105 Probanden ermittelt werden.

Der Mittelwert bei Patienten mit Fraktur betrug 6,633 $\mu\text{mol/l}$ (Standardabweichung 2,47) und der Median 6,19 $\mu\text{mol/l}$.

In der Patienten-Gruppe, in welcher niemand eine Fraktur erlitten hatte, lag der Mittelwert bei 7,11 $\mu\text{mol/l}$ (Standardabweichung 2,68) und der Median bei 7,00 $\mu\text{mol/l}$.

Im folgenden Boxplot sind Ausreißer als Kreise dargestellt.

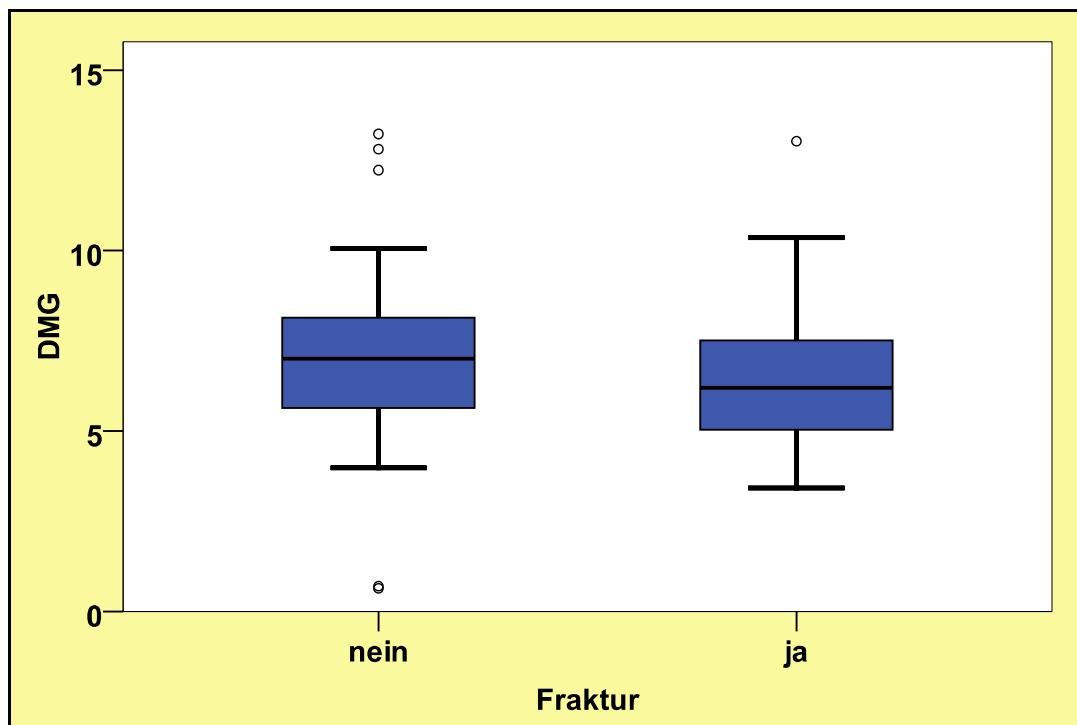


Abb. 18: Dimethylglycin ($\mu\text{mol/l}$) bei Fraktur

5.3.4 Methionin bei Fraktur

Die schwefelhaltige proteinogene Aminosäure Met stellt innerhalb des Stoffwechsels Methylgruppen bereit und wird in mehreren Schritten zu Homoserin und Cystein abgebaut.

Met kann jedoch in einer Vitamin B12- und Folsäure-abhängigen Reaktion aus HC durch Remethylierung zurückgewonnen werden.

Das Met wurde bei 108 Patienten gemessen.

Bei den 54 Patienten, bei denen eine Fraktur nachgewiesen wurde, lag der gemessene Mittelwert des Met bei 22,50 $\mu\text{mol/l}$ (Standardabweichung 5,28) und der Median bei 22,13 $\mu\text{mol/l}$.

Bei den Probanden ohne Fraktur betrug der Mittelwert 22,45 $\mu\text{mol/l}$ (Standardabweichung 4,13) und der Median bei 22,34 $\mu\text{mol/l}$.

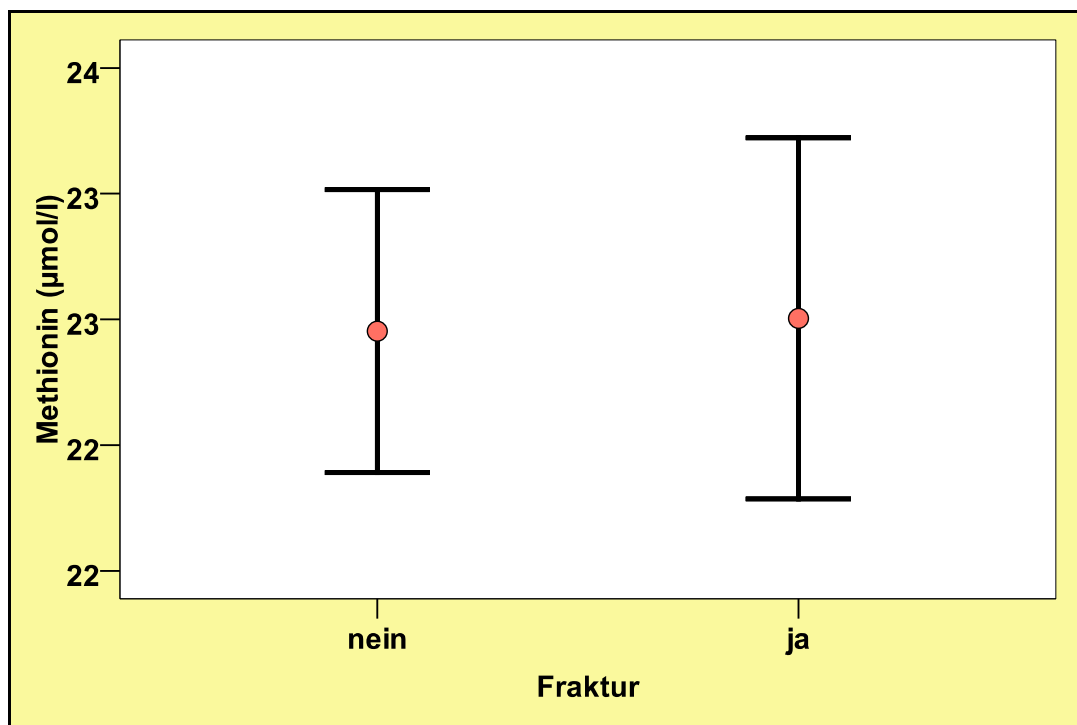


Abb. 19: Methionin ($\mu\text{mol/l}$) bei Fraktur

5.4 Crosslinks

5.4.1 Pyridinolin und Desoxypyridinolin bei Fraktur

Kollagen besteht aus 3 Polypeptidketten, welche in einer Dreierhelix verflochten sind und durch sogenannte Crosslinks (Querverbindungen) stabilisiert werden. Diese aminosäure-ähnlichen CL werden Pyridinolin und Desoxypyridinolin genannt.

Diese entstehen von Kollagenfibrillen durch Kondensation von Lysin- oder Hydroxylysin.

Ein Abbau des Knochens, wie beispielsweise bei Osteoporose, führt zu einer Freisetzung von Pyr und Dpyr und kann, da die CL renal ausgeschieden werden, im Urin gemessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 95 Patienten die sog. CL Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin bestimmt.

Bei 17 Patienten zeigten sich die CL erhöht, bei den restlichen 78 Probanden ergaben sich Normalwerte. Es gelten allgemein folgende Referenzbereiche: 23 – 83 nmol/mmol Kreatinin für Pyridinolin und für Desoxypyridinolin 6 – 26 nmol/mmol Kreatinin.

Frakturereignisse traten bei 48 Probanden auf, bei 10 dieser Patienten ergaben sich erhöhte CL-Werte, 38 Patienten hatten Normalwerte geboten. Bei 47 Patienten konnte keine Fraktur nachgewiesen werden; in dieser Gruppe zeigten 7 Probanden erhöhte CL-Werte, die verbleibenden 40 Probanden wiesen Normalwerte auf.

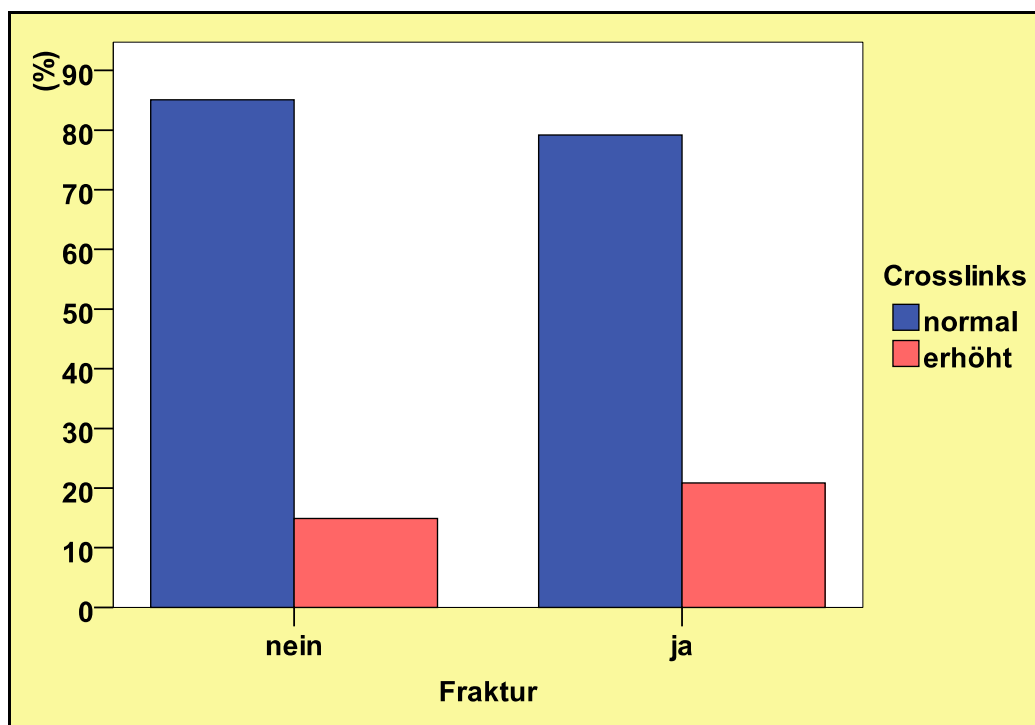


Abb. 20: Crosslinks bei Fraktur

5.4.2 Crosslinks und Homocystein

Von den 77 Patienten mit normalen CL-Werten wiesen 9 Personen ein erhöhtes Homocystein auf und 68 Personen zeigten normale Werte.

In der Gruppe mit erhöhten CL hatten 6 Personen ein erhöhtes HC und 11 Personen zeigten einen HC-Wert im Normbereich.

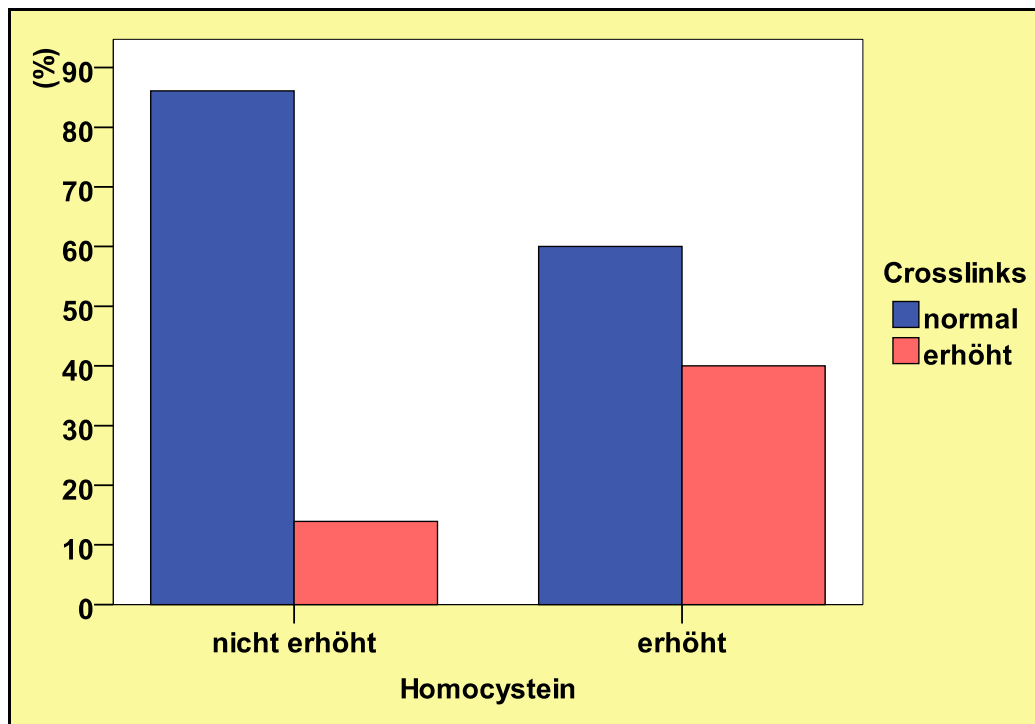


Abb. 21: Crosslinks und Homocystein

5.5 Parameter der Labordiagnostik bei Osteoporose und Homocystein

5.5.1 Vitamin B12

Vitamin B12 fungiert im HC-Stoffwechsel als Cofaktor bei der Remethylierung des HC zu Met. Es wird nur zusammen mit dem Intrinsic factor der Belegzellen des Magens im Ileum resorbiert. Bei insgesamt 97 Probanden wurde das Vitamin B12 bestimmt, ein Mangelzustand konnte bei keinem der Teilnehmer nachgewiesen werden. Bei den Patienten mit nicht erhöhten HC-Spiegeln lag der Mittelwert bei 339 pmol/l und der Median bei 285 pmol/l. In der Probanden-Gruppe mit erhöhten HC-Werten lag der Mittelwert bei 254 pmol/l und der Median bei 238 pmol/l. Dies wird in der folgenden Abbildung dargestellt.

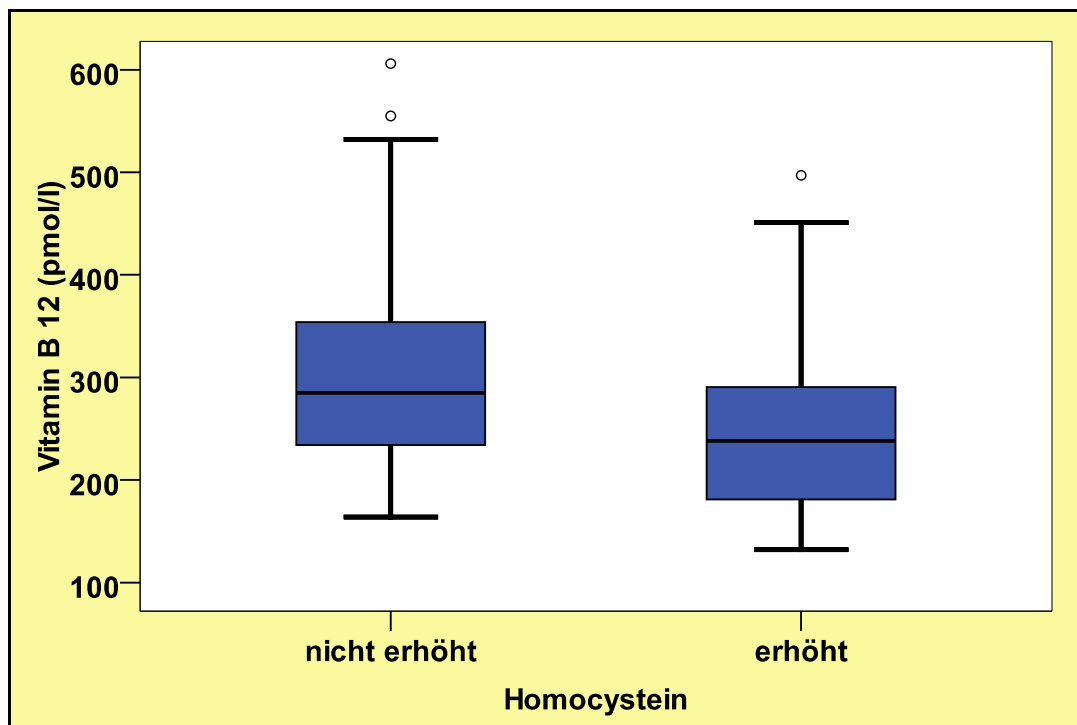


Abb. 22: Vitamin B 12 (pmol/l) bei Homocystein

5.5.2 Folsäure

Die Folsäure ist ebenso wie das Vitamin B12 an der Remethylierung des HC zu Met beteiligt. Bei 97 Teilnehmern dieser Studie wurde die Folsäure-Konzentration gemessen, ein Folsäuremangel war bei keinem Patienten aufgefallen. In der Patienten-Gruppe, bei denen sich kein erhöhtes HC ergab, lag der Mittelwert der Folsäure bei 12,9 (nmol/l) und der

Median bei 11,5 nmol/l. Bei den Probanden, welche erhöhte HC-Werte im Serum aufwiesen, lag der Mittelwert bei 9,3 nmol/l und der Median bei 8,0 nmol/l. In der folgenden Abbildung 23 ist dies im Boxplot dargestellt.

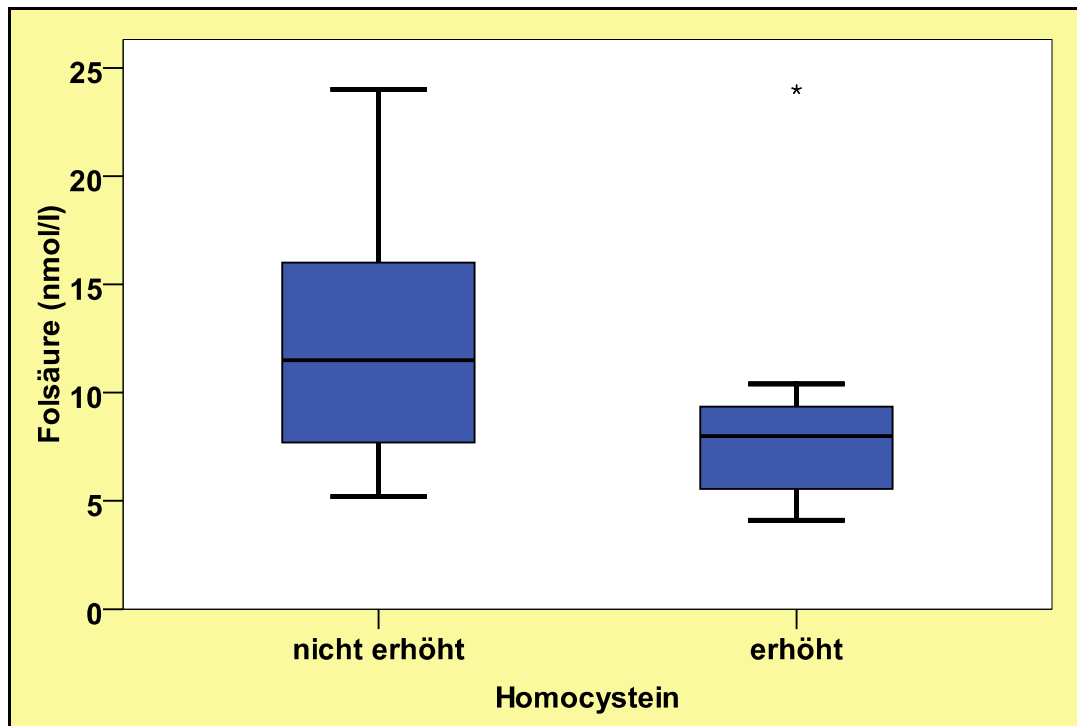


Abb. 23: Folsäure (nmol/l) bei Homocystein

5.5.3 Alkalische Phosphatase

Die AP ist ein wichtiges Stoffwechsellenzym, das unter anderem im Knochen vorkommt. Der Name des Enzyms leitet sich ab von seiner Aufgabe, Phosphat-Gruppen von bestimmten Molekülen wie Proteinen, Nukleotiden und Alkaloiden zu entfernen. Es arbeitet am besten im alkalischen Bereich bei einem pH-Wert über 7.

Bei 107 Patienten wurde die AP bestimmt; es ergaben sich für alle Personen normale Werte.

5.5.4 Ostase

Die Knochen-spezifische alkalische Phosphatase wird Ostase genannt. Sie wird bei der Kollagenreifung von Osteoblasten abgegeben und verhindert wahrscheinlich die Kalziumeinlagerung in den Knochen.

Bei 102 Patienten wurde die Ostase gemessen. Bei 8 Probanden ergab sich ein erniedrigter Wert, 10 Probanden zeigten einen erhöhten Ostase-Wert und 84 Patienten hatten normale Werte. Zugleich zeigte sich ein erhöhtes HC bei 12 Patienten mit Normalwerten und 3 Patienten mit einer erhöhten Ostase.

In dem folgenden Balkendiagramm ist die Ostase bei erhöhtem beziehungsweise nicht-erhöhtem HC dargestellt.

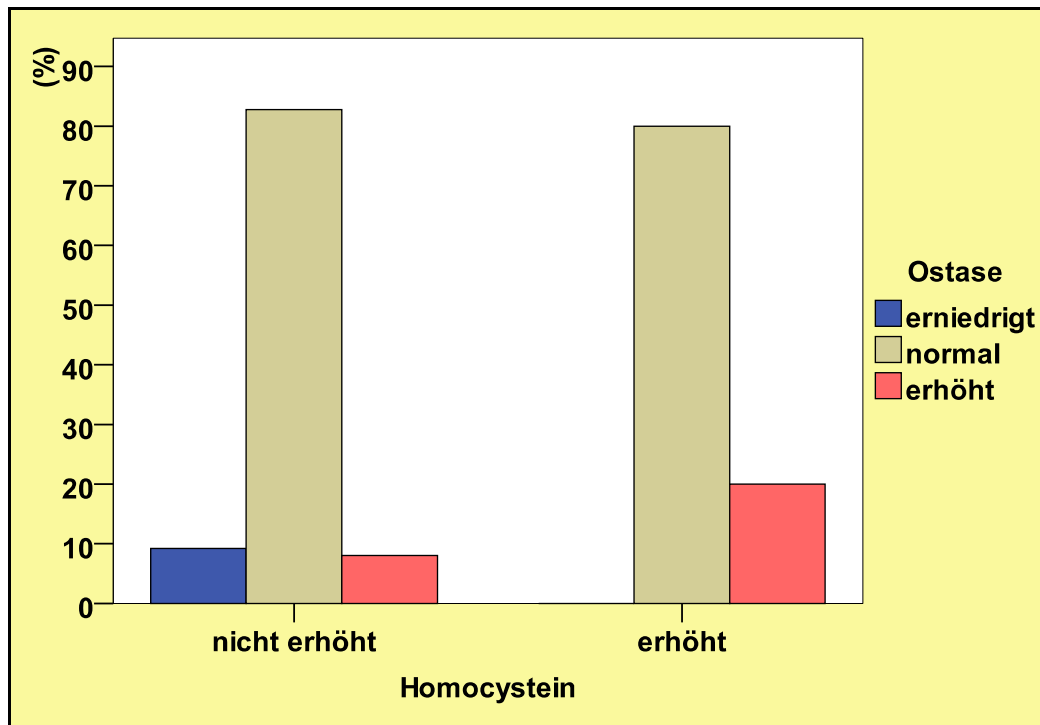


Abb. 24: Ostase und Homocystein

5.5.5 Serum-Kalzium

Mehr als zwei Drittel, etwa 70% des Knochens, bestehen aus der mineralischen Komponente. Neben Kalzium und Phosphat finden sich als Mineralstoffe auch Magnesium, Natrium, Kalium, Chlorid und Fluorid in unterschiedlichen Mengen.

Bei 107 der teilnehmenden Probanden wurde das Serum-Kalzium bestimmt. 4 Personen zeigten erhöhte, 2 Personen erniedrige Kalzium-Werte. Bei 101 Patienten wurde ein normales Serum-Calcium ermittelt. Zugleich zeigte sich ein erhöhtes HC bei 15 Patienten der Gruppe mit Normwerten und bei 2 Patienten mit erhöhtem Kalzium.

Dies ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

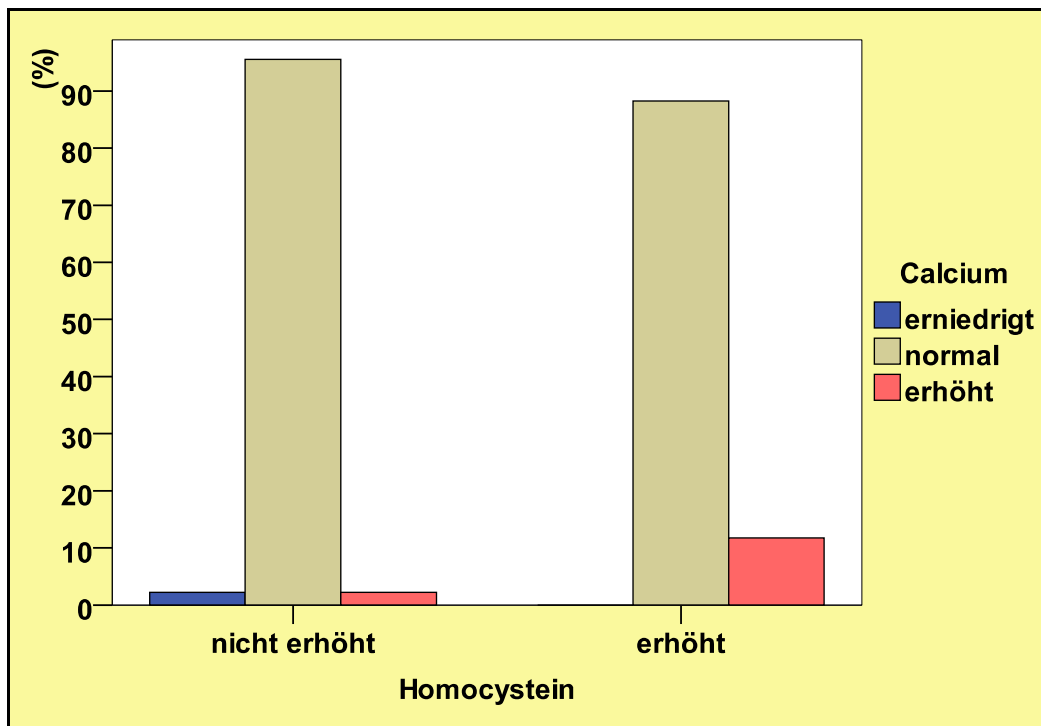


Abb. 25: Kalzium und Homocystein

5.5.6 Serum-Phosphat

Phosphat wird zusammen mit Kalzium in den Knochen eingelagert, um ihn auszuhärten. Normalerweise wird ständig altes Knochenmaterial abgebaut und durch neues ersetzt. Ist nun der Phosphatgehalt im Blut zu hoch, wird vermehrt Parathormon gebildet, was zur Folge hat, dass die Osteoklasten verstärkt dazu angeregt werden, Knochenmaterial abzubauen.

Das Serum-Phosphat wurde bei insgesamt 62 Patienten bestimmt. 56 Probanden zeigten normale Werte; bei jeweils 3 Probanden ergaben sich erhöhte beziehungsweise erniedrigte Werte für das Serum-Phosphat.

Eine zugleich erhöhte HC-Konzentration ließ sich für 12 Patienten mit Normwerten ermitteln.

6. Diskussion

Eine Untersuchung von weiteren als den bisher bekannten Risikofaktoren für das Auftreten einer Osteoporose erscheint sehr sinnvoll, da die Osteoporose die häufigste Stoffwechselkrankheit des Skelettsystems darstellt.

Die Osteoporose ist von der WHO in die Liste der zehn weltweit bedeutendsten Krankheiten aufgenommen worden. In Deutschland wird die Zahl der Erkrankten auf 6 – 7 Millionen geschätzt.

Die Hypothese, dass eine erhöhte HC-Konzentration im Serum zur Entstehung einer Osteoporose beitragen könnte, wurde erst vor einigen Jahren aufgestellt. Es war aufgefallen, dass Patienten, welche an einer hereditären Homocysteinurie litten, meist an einer frühzeitig einsetzenden Osteoporose erkrankten. Einige klinische Daten weisen darauf hin, dass der erhöhte HC-Spiegel im Serum mit einer gesteigerten Knochenresorption einhergeht. Dieser Vorgang könnte die Verringerung der Knochenstabilität und somit die erhöhte Frakturanfälligkeit erklären.

Drei große Kohorten-Studien, die „Rotterdam-Studie“ und „Longitudinal Aging Study Amsterdam“ (Niederlande) [46] und die „Framingham-Studie“ (USA) hatten sich damit beschäftigt, einen Zusammenhang zwischen erhöhten HC-Spiegeln und dem Auftreten von Frakturen bei der altersabhängigen Osteoporose herzustellen.

In den niederländischen Studien (mit einer Laufzeit von drei bis acht Jahren) ergab sich, dass etwa 19 Prozent der Osteoporose-Patienten mit hohen HC-Werten einen Knochenbruch erlitten. Es konnte kein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Probanden festgestellt werden. Auswirkungen auf die Knochendichte konnten nicht nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse konnte die „Framingham-Studie“ zeigen [63]. Auch hier traten vermehrt Knochenbrüche bei hohen HC-Spiegeln im Serum auf. Frauen hatten ein doppeltes Risiko, Männer ein vierfaches Risiko eine Fraktur zu erleiden.

So bedeutet es dennoch nicht zwingend, dass das erhöhte HC kausal für das Auftreten von Frakturen verantwortlich ist. Dies lässt sich aus den Kohortenstudien nicht ableiten. Möglicherweise könnte der hohe HC-Spiegel nur ein Marker für eine andere Osteoporose-

Ursache sein, beispielsweise ein Östrogenmangel oder als Marker für einen schlechten Ernährungszustand [73].

Ein Zusammenhang könnte den Vitaminen B12, B6 und Folsäure zugeschrieben werden, da niedrige Werte dieser Vitamine die primären bestimmenden Faktoren des HC und möglicherweise mit einer erniedrigten Knochendichte assoziiert sind. Eine erhöhte HC-Konzentration lässt sich durch eine vermehrte Zufuhr von Vitamin B12 und Folsäure senken. In einigen Untersuchungen wurden eine höhere Folsäure- und Vitamin B12-Konzentration im Serum mit einer erhöhten Knochenmineraldichte und einer geringeren Rate an Knochensubstanzverlust bei postmenopausalen Frauen assoziiert [15, 16].

Eine verminderte Knochendichte ist einer der bedeutendsten Risikofaktoren für Frakturen [24] und repräsentiert möglicherweise, dass ein erhöhtes HC das Frakturrisiko beeinflusst. Allerdings gibt es keinen bekannten biologischen Mechanismus, das HC einen Effekt auf die Knochendichte hat.

In verschiedenen Beobachtungsstudien ist der Versuch, einen Zusammenhang zwischen HC und der Knochendichte herzustellen, fehlgeschlagen [15, 36, 4].

Eine norwegische Studie (Hordaland Studie) ergab, dass eine Assoziation zwischen erhöhten HC-Werten und niedrigen Folsäurekonzentrationen und einer verminderten Knochendichte besteht [35].

In einer Studie von Morris et al. [65] wurde bei 1550 Frauen und Männern in einem Alter von über 55 Jahren, welche an NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey) teilgenommen hatten, die Knochendichte der Hüfte gemessen. Die Probanden, welche an einer Osteoporose erkrankt waren, wiesen eine signifikant höhere HC-Konzentration im Serum auf als jene Teilnehmer mit einer normalen Knochendichte. Obgleich die Knochendichte den größten Einflusswert auf die Knochenfestigkeit darstellt, ist diese nicht alleinig bestimmend für die Qualität der Knochen.

Zum einen werden durch aktive Muskelkraft Knochenverformungen ausgelöst, welche analysiert und entsprechend ihres Ausmaßes die Knochenfestigkeit durch die Arbeit der Osteoblasten und Osteoklasten angepasst werden. Bei körperlicher Aktivität wird Knochen aufgebaut, Immobilität verursacht Knochenverlust und Abnahme der Knochenfestigkeit.

Zum anderen spielen nicht-mechanische Faktoren wie Hormone, Medikamente und Nahrungsbestandteile eine Rolle. Zum Beispiel beeinflusst das Parathormon die Osteoblastenaktivität, Bisphosphonate die Osteoklastentätigkeit, die Muskelentwicklung wird durch Wachstumshormon und Testosteron, durch Kalzium und Phosphat wird die spontane Mineralisation gefördert.

Kollagenfasern sind das Gerüst der strukturellen Knochenmatrix. Dieses Gerüst wird durch die sogenannten Crosslinks zwischen den Kollagenfasern stabilisiert.

Bereits vor vielen Jahren hatte Mc Kusick [62] die Hypothese aufgestellt, dass die Anomalie des Skeletts bei Patienten mit Homocysteinurie auf eine Beeinflussung des Homocysteins auf die Kollagen-CL zurückzuführen ist, bisher konnte diese Hypothese jedoch nur bedingt belegt werden. Eine Studie von Saito et al. [77] könnte den Beweis erbringen, welcher die Hypothese von Mc Kusick unterstützt. Frauen, welche anamnestisch eine Hüftfraktur erlitten hatten, hatten höhere HC-Konzentrationen und signifikant niedrigere Kollagen-CL, welche durch Knochenbiopsie entnommen und gemessen wurden, als die Teilnehmer der Kontrollgruppe. Dass sich nur eine geringe Differenz der HC-Konzentrationen zwischen beiden Gruppen zeigte, deutet darauf hin, dass weitere Faktoren für den Abbau von CL beteiligt sein könnten.

In einer Studie von Gerdhem et al [34] ergaben sich bei Frauen mit hohen HC-Spiegeln ($> 17,3 \mu\text{mol/l}$) signifikant höhere Werte der Marker für Knochenabbau und Knochenaufbau im Vergleich zu den Probanden, bei denen ein niedriges HC ermittelt wurde. In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Knochen-spezifischen alkalischen Phosphatase (Ostase) und HC aufgezeigt werden.

Carmel et al. [17] zeigten auf, dass die Konzentrationen der AP und des Osteocalcin bei Patienten mit einem erniedrigten Vitamin B12-Spiegel niedrigere Werte ergaben und nach Substitution von Vitamin B12 Normalwerte aufwiesen. Eine zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte Studie konnte belegen, dass durch Vitamin B12 die Aktivität der AP stimuliert, und die Proliferation der Stammzellen im Knochenmark vermehrt wurde [49].

Reynolds et al. [75] stellten heraus, dass Patienten, welche eine Hüftgelenksfraktur erlitten hatten, im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ein niedrigeres Vitamin B6 im Serum aufwiesen; es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Vitamin B6 einen Einfluss auf die Aktivität der Proteine habe, welche die Osteoblasten-Aktivität regulieren.

Mc Kusick [62] hatte angedeutet, dass das HC Kollagen-CL schädigen könnte; Vitamin B6 ist ein Coenzym der Lysyl-Oxidase [7], welche als einziges Enzym an der Quervernetzung der Kollagenfibrillen beteiligt ist.

In der Studie von Saito et al. [77] war die Vitamin B6-Konzentration in der Patienten-Gruppe mit Fraktur verglichen mit der Kontroll-Gruppe nur halb so hoch. Möglicherweise führt ein niedriges Vitamin B6 und nicht ein erhöhtes HC zu einem Absinken der CL und zu einer Abnahme der Knochenfestigkeit.

Dass möglicherweise ein Vitamin B12-Mangel ein Risikofaktor für Osteoporose ist, ist einigen Studien zu entnehmen, welche an Patienten mit perniziöser Anämie, infolge einer Malabsorption bei Mangel an Intrinsic Faktor, durchgeführt wurden. Eastell et al. [30] fanden heraus, dass Patientinnen in der Menopause, die an perniziöser Anämie erkrankt waren, im Vergleich zur gesunden Kontroll-Gruppe, eine niedrigere Knochendichte im Bereich der Lendenwirbel zeigten.

In späteren Untersuchungen an einem 68-jährigen männlichen Patienten mit perniziöser Anämie und schwerer Osteoporose durch Melton und Kochman [64], konnte durch eine Vitamin B12-Substitution neben der Therapie mit Etidronat eine deutlichere Erhöhung der Knochendichte im Bereich der Wirbelsäule und des Femur nachgewiesen werden, als bei alleiniger Therapie mit Etidronat.

Eine neuere Studie an 194 älteren Personen hatte gezeigt, dass das Vitamin B12 mit der Knochendichte bei weiblichen, nicht jedoch bei männlichen Probanden zusammenhängen könnte [27]. Bei Patientinnen mit einer klinisch manifesten Osteoporose ergaben sich signifikant niedrigere Vitamin B12-Konzentrationen und höhere Werte der MMA, welche einen sensitiven Marker eines Vitamin B12-Mangelzustandes darstellt [3].

Tucker et al. [95] untersuchten Teilnehmer in der Framingham Offspring Study und fanden heraus, dass männliche Probanden mit einer Vitamin B12-Konzentration von weniger als 148 pmol/l eine niedrigere Knochendichte im Bereich der Hüfte, und weibliche Personen eine niedrigere Knochendichte im Bereich der Wirbelsäule aufwiesen als Probanden der Kontroll-Gruppe mit höheren Vitamin B12-Konzentrationen. Morris et al. [65] konnten belegen, dass NHANES III-Teilnehmer, welche an Osteoporose erkrankt waren, ein signifikant niedrigeres Vitamin B12 und ein höheres Serum-MMA zeigten, als Probanden der Kontroll-Gruppe mit normaler Knochendichte. Eine niedrigere Knochendichte war mit niedrigem Vitamin B12 assoziiert, während der Folsäure-Status nicht mit der BMD in Zusammenhang gebracht werden konnte. In einer anderen Studie ergab sich allerdings eine signifikant niedrigere Folsäure im Serum bei Patienten mit Osteoporose bzw. Osteopenie [15] und in einer Untersuchung von iranischen postmenopausalen Patientinnen war die Folsäure positiv mit der Knochendichte im Bereich der Lendenwirbelsäule korreliert [36].

Eine Studie, welche von Dhonukshe-Rutten et al. [28] durchgeführt wurde, deutete auf einen synergistischen Effekt zwischen HC und Vitamin B12 in der Hinsicht auf das Mass der Knochenqualität bei weiblichen Personen hin.

Bozkurt et al. [10] untersuchten bei postmenopausalen Frauen türkischer Nationalität die Beziehung zwischen HC, seinen Metaboliten und Folsäure- und Vitamin B12-

Konzentrationen und deren Verbindung zur Knochendichte des Femur und der Lendenwirbelkörper, welche mittels DXA bestimmt wurde. Eine Verbindung konnte zwischen der HC-Konzentration und dem Vitamin B12-Spiegel und der Osteoporose, nicht jedoch zwischen der Folsäure und der Osteoporose hergestellt werden.

Weitere klinische Versuche deuten darauf hin, dass eine Hyperhomocysteinämie zwar das Frakturrisiko erhöht, jedoch einen geringen Effekt auf die Knochendichte hat. Messwerte der Knochenumbaumarker deuten eine Veränderung des Knochenstoffwechsels in Richtung der Knochenresorption an [42]. Diese Beobachtungen wurden durch Tierversuche bekräftigt, welche zeigten, dass Tiere mit erhöhtem Homocystein-Spiegel eine verminderte Knochendichte und eine Stimulierung des Knochenabbaus aufwiesen. Das HC hatte sich mittels Kollagen-Bindung im Knochen angereichert [43]. Einen weiteren Hinweis auf eine erhöhte Knochenresorption zeigten Studien an Zellkulturen. Hier konnte demonstriert werden, dass ein erhöhter HC-Wert die Aktivität der Osteoklasten, nicht aber der Osteoblasten anregte. Es scheint, als habe eine Hyperhomocysteinämie nachteilige Effekte auf die extrazelluläre Knochenmatrix und beeinträchtigt die Kollagen-Quervernetzung.

Nach Analyse der Literatur und der eigenen Daten bleibt es schwierig, belastbare Schlussfolgerungen und Interpretationen zu ziehen.

Es verbleiben Zweifel, ob das Homocystein oder die B-Vitamine, B6, B12 und Folsäure, einen direkten Einfluss auf das Knochenremodelling, die Knochendichte oder die Knochenqualität nehmen.

Sollte HC die Knochenfestigkeit direkt beeinflussen, kann jedoch nicht daraus gefolgert werden, dass das Absenken des HC-Spiegels und Substitution von B-Vitaminen eine effektive Behandlung hinsichtlich der Fraktur-Prävention sind.

Dies kann nur in einer randomisierten klinischen Studie, im Sinne einer Interventionsstudie, erfolgen.

Bisher existiert jedoch nur eine Studie von Sato et al. Hier wurde bei japanischen Patienten, welche eine Hemiplegie infolge eines Apoplexes erlitten hatten, erforscht, ob eine Behandlung mit Folsäure und Vitamin B12 das Risiko des Auftretens einer Hüftfraktur senkte. Die Patienten, alle mit erhöhtem HC-Spiegel ($> 19,9 \mu\text{mol/l}$) und einer niedrigen Folsäure-Konzentration ($< 5,4 \text{ nmol/l}$), wurden randomisiert und erhielten in der einen Gruppe eine tägliche Dosis von 5 mg Folsäure und 1500 μg Vitamin B12 bzw. in der

Kontroll-Gruppe einen Placebo und wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren beobachtet. In der behandelten Gruppe waren Folsäure und Vitamin B12 im Serum angestiegen und das HC um 38% gesunken. In der Placebo-Gruppe waren Folsäure und Vitamin B12 abgesunken und die HC-Konzentration um etwa 31% gestiegen. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe waren 80% weniger Frakturen im Bereich der Hüfte aufgetreten und das Risiko des Auftretens anderer Frakturen wurde um 76% reduziert. Jedoch erweist es sich zum einen als schwierig, diese Ergebnisse auf andere Populationen zu übertragen, zum anderen kann nicht festgestellt werden, ob das niedrigere Frakturrisiko dem Absenken des HC-Spiegels, dem Anstieg der B-Vitamin-Konzentrationen oder einer Kombination aus beidem zugeschrieben werden kann. Alle ansonsten existierenden Beobachtungsstudien zu der Frage, ob HC oder B-Vitamine einen Einfluss auf die Qualität des Knochens oder Frakturen, welche durch eine Osteoporose bedingt sind, haben, deuten darauf hin, dass diese Faktoren zwar mit der „Gesundheit“ oder „Krankheit“ des Knochens assoziiert sind, sie sagen jedoch nichts über die Stärke des Einzelfaktors aus und auch nichts über den eventuellen Wert einer Substitution beziehungsweise diesbezügliche therapeutische Intervention.

6.1 Hatten die Patienten, bei welchen eine erhöhte HC-Konzentration im Serum nachgewiesen werden konnte, anamnestisch im Krankheitsverlauf eine Niedrigenergiefraktur erlitten und lässt sich ein Zusammenhang herstellen?

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 111 Probanden die HC-Konzentration im Serum bestimmt und mittels Akten- und Befundstudium Frakturen dokumentiert. Bei 17 Patienten wurde ein erhöhter HC-Spiegel nachgewiesen. Eine Fraktur hatten zu diesem Zeitpunkt 54 Patienten erlitten. 12 von den 17 Patienten mit erhöhtem HC-Spiegel hatten im Krankheitsverlauf eine Fraktur erlitten. Da also mehr als doppelt so viele Patienten eine positive Frakturanamnese aufwiesen, kann man hier zumindest von einem deutlichen oder auffälligen Trend sprechen.

In der Multivarianzanalyse wurden die abhängige Variable (Fraktur) und 5 unabhängige Variablen (Alter, Geschlecht, CL, DMG und HC) und somit 90 Patientenfälle in die binär logistische Regression einbezogen. Mit einem Wert von 0,026 ergab sich für das Homocystein ein signifikantes Ergebnis, so dass die Ergebnisse einen Anhalt dafür bieten,

dass das Risiko des Auftretens einer Fraktur bei erhöhter HC-Konzentration im Serum erhöht ist.

6.2 Welcher Zusammenhang besteht zwischen HC und den Vitaminen B12 und Folsäure?

Bei keinem der Probanden konnte ein Vitaminmangel-Zustand nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Referenzbereiche der allgemeinen Literatur als Maßstab angenommen, wie in Kapitel 1.9 beschrieben. Sowohl zwischen Vitamin B12 und HC, als auch zwischen Folsäure und HC besteht ein gegenläufiger Zusammenhang, das heißt, bei erhöhtem HC zeigen sich niedrigere Vitamin-Konzentrationen.

Für das Vitamin B12 und HC ergibt sich im Mann-Whitney-U-Test eine Signifikanz von 0,028 und für die Folsäure ebenfalls im Mann-Whitney-U-Test eine hohe Signifikanz von 0,006. Dies unterstützt die allgemein gültige Meinung, dass die Folsäure den stärksten Einfluss auf die HC-Konzentration hat.

6.3 Korrelieren die Messwerte der im HC-Stoffwechsel bedeutsamen Metaboliten Cystathionin, Dimethylglycin und Methionin mit der HC-Konzentration und welche Bedeutung ist dem zuzuschreiben?

Cys entsteht aus HC durch Kondensation seiner Sulfhydrylgruppe mit der Hydroxylgruppe von Serin. Diese Reaktion wird durch die CBS Vitamin B6-abhängig katalysiert.

Met wird mit Nahrungsproteinen aufgenommen und kann durch Verknüpfung mit ATP zu S-Adenosylmethionin umgesetzt werden, welches als wichtiger Methylgruppen-Donor dient. Zum einen kann Met mit Serin zu Homoserin und Cystein umgewandelt werden, zum anderen kann Met aus HC zurückgewonnen werden, indem in einem Vitamin B12-abhängigen Schritt eine Methylgruppe (zum Beispiel von Betain oder Tetrahydrofolsäure) auf S-Adenosylhomocystein übertragen und zu S-Adenosylmethionin umgesetzt wird, aus dem dann Met freigesetzt werden kann.

Für Cys und HC und für Met und HC konnten keine signifikanten Korrelationen gemessen werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass bei keinem der Patienten ein Vitaminmangel-Zustand bestand.

DMG entsteht, indem die labile Methylgruppe des Betains durch das in der Leber und Niere vorkommende und Kofaktor-unabhängige Enzym Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) auf HC übertragen wird; DMG wiederum hemmt die BHMT. Für DMG und HC wurde im Mann-Whitney-U-Test mit 0,054 eine grenzwertige Signifikanz ermittelt. Dies lässt

sich unter Umständen mit dem hemmenden Effekt des DMG auf die BHMT und damit auf die verminderte Remethylierungsrate erklären.

6.4 Zeigten die Patienten, als Ausdruck eines gesteigerten Knochenabbaus, eine erhöhte Ausscheidung von Kollagen-Crosslinks im Urin und korrelieren diese Werte mit der Konzentration des HC im Serum bzw. mit dem Auftreten einer Fraktur?

Die Kollagen-Crosslinks PYD und DPD wurden bei 94 Teilnehmern gemessen. Bei 17 Patienten konnte eine erhöhte Ausscheidung nachgewiesen werden. Der Vergleich der Patienten-Gruppen mit erhöhtem bzw. nicht erhöhtem HC zeigt, dass sich bei 40% der Probanden eine erhöhte Ausscheidung der CL und eine erhöhte HC-Konzentration ergab, während bei 13,9% der Probanden mit erhöhten CL nicht erhöhte HC-Spiegel bestimmt wurden. Im exakten Test nach Fisher ergab sich somit eine Signifikanz von 0,027.

Von den 17 Teilnehmern mit einer erhöhten CL-Ausscheidung hatten 10 Patienten eine Fraktur erlitten. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der erhöhten CL-Ausscheidung und dem Auftreten einer Fraktur konnte nicht hergestellt werden.

6.5 Steigt die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten HC-Konzentration im Serum mit zunehmendem Lebensalter?

Die allgemeine Auffassung geht in die Richtung, dass der HC-Spiegel grundsätzlich altersabhängig ist und mit dem Alter ansteigt. Die meisten Teilnehmer dieser Studie waren zwischen 61 und 71 Jahre alt. Auch in der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die Patienten mit erhöhtem HC-Spiegel im Durchschnitt (Mittelwert 68,82 Jahre, Median 71 Jahre) älter waren, als Patienten mit nicht erhöhter HC-Konzentration (Mittelwert 64,17 Jahre, Median 66 Jahre). Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich so eine Signifikanz von 0,035.

6.6 Gibt es geschlechtliche Unterschiede bei den Nachweisen eines erhöhten HC-Spiegels und dem Auftreten einer Fraktur?

Sowohl hinsichtlich der HC-Konzentration im Serum als auch des Auftretens einer Fraktur konnten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden.

Bei 110 Personen wurde die HC-Konzentration im Serum ermittelt, 85 Personen weiblichen und 25 Personen männlichen Geschlechts. Dabei konnte bei 14 weiblichen und bei 3 männlichen Probanden ein erhöhter HC-Spiegel bestimmt werden, das heißt, lediglich 16,5%

der Frauen im Vergleich zu 12,0% der Männer zeigten eine erhöhte HC-Konzentration im Serum.

Die Frakturanamnese konnte bei 108 Personen erhoben werden, es handelte sich um 84 weibliche und 24 männliche Probanden. Dabei hatten 43 Patientinnen und 11 Patienten eine Fraktur erlitten, das heißt, dass 51,2% bei den Frauen 45,8% bei den Männern gegenüberstehen und sich somit kein signifikanter Unterschied ergab.

7. Literaturverzeichnis

1. Allen R.H., Stapler S.P., Lindenbaum J.: Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism. *Metabolism* 42 (1993), 1448 – 1460
2. Allolio B., Schulte H.M. et al: *Praktische Endokrinologie*. Urban & Schwarzenberg, München (1996), 319 – 336
3. Baik H.W., Russell R.M.: Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr* 19 (1999), 357 – 377
4. Baines M., Kredan M.B., Usher J. et al.: The association of homocysteine and its determinants MTHFR genotype, folate, vitamin B12 and vitamin B6 with bone mineral density in postmenopausal British women. *Bone* 40 (2007), 730 – 736
5. Behnke B., Altrogge H., Delling G., Kruse H.P., Müller W.D.E.: Bone mineral density in pediatric patients after renal transplantation. *Clin Nephrol* 46 (1998), 24 – 29
6. Bikle D.D.: Biochemical markers in the assessment of bone disease. *Am J Med* 103 (1997), 427 – 436
7. Bird T.A., Levene C.I.: Lysyl oxidase: evidence that pyridoxal phosphate is a cofactor. *Biochem. Biophys. Res Commun* 108 (1982), 1172 – 1180
8. Boushey C.J., Beresford S.A.A., Omenn G.S., Motulsky A.G.: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 274 (1995), 1049-1057
9. Boushey C.J., Beresford S.A.A., Omenn G.S., Motulsky A.G.: A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 274 (1995), 1049-1057
10. Bozkurt N., Erdem M., Yilmaz E., Erdem A., Biri A., Kubatova A., Bozkurt M.: The relationship of homocysteine, B12 and folic acid with the bone mineral density of the femur and lumbar spine in Turkish postmenopausal women. *Arch Gynecol Obstet* 280 (2009), 381 – 387
11. Brattström L.E., Israelsson B., Jepson J.O., Hultberg B.L.: Folic acid: An innocuous means to reduce plasma homocysteine. *Scand J Clin Lab Invest* 48 (1988), 215 – 221
12. Brönstrup et al. : Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B12 on plasma homocysteine concentrations in healthy, young women. *Am J Clin Nutr* 68 (1998), 1104-1110

13. Busch M. et al: Etablierung und Evaluierung der quantitativen Bestimmung von Homocystein und den Metaboliten Cystathionin, Methylmalonsäure und 2-Methylzitronensäure im Serum mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Dissertation (2000), Jena
14. Cabrera Dominguez C., Henriquez Sosa M., Traba M.L., Villafane Alvarez E., de la Piedra C. : Biochemical markers of bone formation in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis Int* 8 (1998), 147 – 151
15. Cagnacci A., Baldassari F., Rivolta A., Arangino S., Volpe A.: Relation of homocysteine, folate and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. *Bone* 33 (2003), 956 – 959
16. Cagnacci A., Cannoletta M., Baldassari F., Volpe A.: Low vitamin B12 and bone loss: a role for folate deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004), 4770 – 4771
17. Carmel R., Lau K.H., Baylink D.J. et al.: Cobalamin and osteoblast-specific proteins. *N Engl J Med* 319 (1988), 70 – 75
18. Carson N.A.J., Neill D.W.: Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 37 (1962), 505 – 513
19. Cattaneo M.: Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis. *Thromb Haemost* 81 (1999), 165 – 17
20. Cattaneo M., Lombardi R., Lecchi A., Bucciarelli P., Mannucci P.M.: Low plasma levels of vitamin B(6) are independently associated with heightened risk of deep-vein thrombosis. *Circulation* 104 (2001), 2442 – 2446
21. Christen W.G., Glynn R.J., Chew E.Y., Albert C.M., Manson J.E.: Folic acid, pyridoxine and cyanocobalamin combination treatment and age-related mucular degeneration in women. *Arch Intern Med* 169- 4 (2009), 335 – 341
22. Christenson R.H.: Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 30 (1997), 573 – 593
23. Christgau S., Bitsch-Jensen O., Hanover Bjarnason N., Gamwell Henriksen E., Qvist P., Alexandersen P., Bang Henriksen D.: Serum CrossLaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone* 26 (2000), 505 – 511
24. Cummings S.R., Nevitt M.C., Browner W.S. et al.: Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med* 332 (1995), 767 – 773

25. De la Piedra C., Traba M.L., Dominguez Cabrera C., Sosa Henriquez M. : New biochemical markers of bone resorption in the study of postmenopausal osteoporosis. *Clin Chem Acta* 265 (1997), 225 – 234
26. Delmas P. : Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 19 (1990), 1 – 18
27. Dhonukshe-Rutten R.A., Lips M., de Jong N. et al. : Vitamin B12 status is associated with bone mineral content and bone moneral density in frail elderly women but not in men. *J Nutr* 133 (2003), 801 – 807
28. Dhonukshe-Rutten R.A., Pluijm S.M., de Groot L.C. et al.: Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 20 (2005), 921 – 929
29. Di Angelo A., Selhub J.: Homocysteine and thrombotic disease. *Blood* 90 (1997), 1-11
30. Eastell R., Vieira N.E., Yergey A.L. et al.: Pernicious anaemia as a risk factor for osteoporosis. *Cli Sci (lond.)* 82 (1992), 681 – 685
31. Eyre D.R.: New biomarkers of bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab* 74 (1992), 470A - 470C
32. Fenton W.A., Rosenberg L.E.: Disorders of propionate and methylmalonate metabolism.; In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D.: The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York:McGraw-Hill (1995), 1423 – 1449
33. Fowler B.: Disorders of homocysteine metabolism. *J Inher Met Dis* 20 (1997), 270 – 285
34. Gerdhem P., Ivaska K.K., Isaksson A. et al.: Associations between homocysteine, bone turnover, BMD, mortality and fracture risk in elderly women. *J Bone Miner Res* 22 (2007), 127 – 134
35. Gjesdal C.G. et al.: Plasma total homocysteine level and bone mineral density : the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Intern Med* 166 (2006), 88 – 94
36. Golbahar J., Hamidi A., Aminzadeh M.A., Omrani G.R.: Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methylenetetrahydrofolate reductase C667T polymorphism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women: a cross-sectional study. *Bone* 35 (2004), 760 – 765
37. Goyette P., Frosst P., Rosenblatt D.S., Rozen R.: Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in

- severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 56 (1995), 1052-1059
38. Guéant J.L. et al: Association between homocysteine and neurodegenerative disorders: experimental evidences and population studies. *Clin Chem Lab Med* 45 (2007), 5, A6
 39. Harpel P.C., Zhang X., Borth W.: Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *J Nutr* 126 (1996), 1285S – 1296S
 40. Herrmann M., Schmidt J., Umanskaya N. et al.: Stimulation of osteoclast activity by low B-vitamin concentrations. *Bone* 41 (2007), 584 – 591
 41. Herrmann M. et al.: Hyperhomocysteinemia: a major osteoporotic factor. *Clin Chem Lab Med* 45, 5 (2007), A10
 42. Herrmann M. et al.: The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B6 and B12 deficiencies in osteoporosis: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* 45 (2007): 1621 – 1632
 43. Herrmann M., Tami A., Wildemann B., Wolny M., Wagner A., Schorr H., Taban-Shomal O., Umanskaya N., Ross S., Garcia P., Hübner U., Herrmann W.: Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone. *Bone* 44 (2009), 467 – 475
 44. Hillier T.A., Stone K.L., Bauer D.C. et al.: Evaluating the value of repeated bone mineral density measurement and prediction of fractures in older women. *Arch Intern Med* 167 (2007), 155 – 160
 45. Jaques P.F., Bostom A.G., Williams R.R., Ellison R.C., Eckfeldt J.H., Rosenberg I.H., Selhub J., Rozen R.: Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 93 (1996), 7-9
 46. Joyce B.J. et al.: Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 350 (2004), 2033 – 2041
 47. Kamburoglu G., Gumus K., Kadayifcilar S., Eldem B.: Plasma homocysteine, vitamin B12 and folate levels in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244 (2006), 565 – 569
 48. Kang S.S., Zhou J., Wong P.W., Kowalisyn J., Strokosch G.: Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 43 (1988), 414 – 421

49. Kim G.S., Kim C.H., Park J.Y. et al.: effects of vitamin B12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR106 osteoblastic cells. *Metabolism* 45 (1996), 1443 – 1446
50. Klerk M., Verhoef P., Clarke R. et al.: MTHFR 677C-T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 288 (2002), 2023 – 2031
51. Kluijtmans L.A.J., van den Heuvel L.P.W.J., Boers G.H.J., Frosst P., Stevens E.M.B., van Oost B.A., den Heijer M., Trijbels F.J.M., Rozen R., Blom H.J.: Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 58 (1996), 35-41
52. Laryea M.D., Steinhagen F., Pawliczek S., Wendel U.: Simple method for the routine determination of betaine and N,N-dimethylglycine in Blood and urine. *Clin Chem* 44 (1998), 1937 – 1941
53. Le Boff M.S. et al.: Plasma homocysteine and risk of hip fracture among postmenopausal women in Women's Health Initiative. *Clin Chem Lab Med* 45, 5 (2007), A9
54. Liao E.Y. et al.: Effects of skeletal size of the lumbar spine on areal bone density, and the diagnosis of osteoporosis in postmenopausal women in China. *J Bone Miner Metab* 22 (3) (2004), 270 – 277
55. Loscalzo J.: The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 98 (1996), 5-7
56. Mackey D.C., Lui L.Y., Cawthorn P.M. et al.: High-trauma fractures and low bone mineral density in older women and men. *JAMA* 298 (2007), 2381 – 2388
57. Malinow M.R.: Homocysteine and arterial occlusive diseases (Frontiers in medicine). *J Intern Med* 236 (1994), 603-617
58. Malinow, M. R.: Homocysteine and arterial occlusive diseases. *J Int Med.* 236 (1996), 857-858
59. Mc Cully K.S.: Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 23 (1993), 477 – 493
60. Mc Cully K.S.: Chemical pathology of homocysteine. III. Cellular function and aging. *Ann Clin Lab Sci* 24 (1994), 132 – 152
61. Mc Cully K.S.: Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 2 (1996), 386-389
62. Mc Kusick V.A.: Heritable disorders of connective tissue. Edn 3. St. Louis, MO: C.V. Mosby Co, 1966

63. McLean R.R. et al.: Homocysteine as a predictive factor of hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 350 (2004), 2042 – 2049
64. Melton M.E., Kochman M.L.: Reversal of severe osteoporosis with vitamin B12 and etidronate therapy in a patient with pernicious anaemia. *Metabolism* 43 (1994), 468 – 469
65. Morris M.S., Jaques P.F., Selhub J. : Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone* 37 (2005), 234-242
66. Mudd S.H., Finkelstein J.D., Irreverre F., Laster L.: Homocysteinuria: an enzymatic defect. *Science* 143 (1964), 1443 – 1445
67. Nelen W.L.: Hyperhomocysteinaemia and human reproduction. *Clin Chem Lab Med* 39 (2001), 758 – 763
68. Parkinson I.H., Fazzalari N.L.: Interrelationships between structural parameters of cancellous bone reveal accelerated structural change at low bone volume. *J Bone Miner Res* 18 (12) (2003), 2200 – 2205
69. Pietrzik K., Brönstrup A.: Causes and consequences of hyperhomocysteinemia. *Int J Vitam Nutr Res* 67 (1997), 389 – 395
70. Pietrzik K., Prinz-Langenohl R., Dierkes J.: Die Beeinflussung des Homocysteinspiegels durch nutritive Gaben der Vitamine B12, B6 und Folsäure. In: Biesalski H.K., Classen H.G. (Hrsg.): Vitamine, Elektrolyte, Spurenelemente. Thieme Verlag Stuttgart/New York (1995), 32 – 37
71. Perry I.J., Refsum H., Morris R.W., Ebrahim S.B., Ueland P.M., Shaper A.G.: Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged british men. *Lancet* 346 (1995), 1395-1398
72. Peters K.M.: Osteoporose.; In: Bischoff H.P., Heisel J., Locher H.: Praxis der konservativen Orthopädie. Stuttgart, New York: Thieme (2007), 468 – 477
73. Raisz L.G.: Homocysteine and Osteoporotic Fracture – Culprit or Bystander? *N Engl J Med* 350 (2004), 2089 – 2090
74. Rees M.W.;, Rodgers G.G.: Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. *Thromb Res* 71 (1993), 337 – 359
75. Reynolds T.M., Marshall P.D., Brain A.M.: Hip fracture patients may be vitamin B6 deficient. Controlled study of serum pyridoxal-5'-phosphate. *Acta Orthop Scand* 63 (1992), 635 – 638

76. Rosen H.N., Moses A.C., Garber J., Iloputaife I.D., Ross D.S., Lee S.L., Greenspan S.L.: Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* 66 (2000), 100 – 103
77. Saito M., Fujii K., Marumo K.: Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int* 79 (2006), 160 – 168
78. Sato Y., Honda Y., Iwamoto J. Et al.: Effect of folate and mecobalamin on hip fractures in patients with stroke: a randomized controlled trial. *JAMA* 293 (2005), 1082 – 1088
79. Seddon J.M., Gensler G., Klein M.L., Milton R.C.: C-reactive protein and homocysteine are associated with dietary and behavioral risk factors for age-related macular degeneration. *Nutrition* 22 (2006), 441 – 443
80. Selhub et al: Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 270 (1993), 2693-2698
81. Selhub J., Jaques S.D., Bostom A.G., D'Agostino R.B., Wilson P.W., Belanger A.J., O'Leary D.H., Wolf P.A., Schaefer E.J., Rosenberg I.H.: Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Eng J Med* 332 (1995), 286-291
82. Selhub J., Jaques P.F., Wilson P.W.F., Rush D., Rosenberg I. H.: Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 270 (1993), 2693-2698
83. Siris E.S. et al.: Bone mineral density thresholds for pharmacological intervention for prevent fractures. *Arch Intern Med* 164 (2004), 1108 – 1112
84. Stamler J.S., Slivka A.: Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev* 54 (1996), 1 – 30
85. Stapler S.P., Lindenbaum J., Savage D.G., Allen R.H.: Elevation of cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 81 (1993), 3404 – 3413
86. Szulc P., Chapuy M.C., Meunier P.J., Delmas P.D.: Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 91 (1993), 1769 – 1774
87. Tice J.A., Ross E., Coxson P.G. et al.: Cost-effectiveness of vitamin therapy to lower plasma homocysteine levels for the prevention of coronary heart disease: effect of grain fortification and beyond. *JAMA* 186 (2001), 936 – 943

88. Till, U.: Homocystein als Metabolit und seine Wirkung auf Blut- und Gefäßwandzellen. *Akt Ernähr Med* 21 (1996), 246-248
89. Thomas L.: Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. Erweiterte Auflage (2000). TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main
90. Triantafyllou N. et al. *Ann Gen Psychiatry* 7 (2008), 17
91. Tsai J.C., Perella M.A., Yoshizumi M.: Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994), 6369 – 6373
92. Tsai M.Y.: Laboratory assessment of mild hyperhomocysteinemia as an independent risk factor for occlusive vascular diseases. *Clin Chem* 42 (1996), 492-493
93. Tsai M.Y., Arnett D.K., Eckfeld J.H., Williams R.R., Ellison R.C.: Plasma homocysteine and its association with carotid intimal-Medial wall thickness and prevalent coronary heart disease: NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis* 151 (2000), 519 – 524
94. Tsai M.Y., Bignell M., Yang F., Welge B.G., Graham K.J., Hanson N.Q.: Polygenic influence on plasma homocysteine: association of two prevalent mutations, the 844ins68 of cystathionine beta-synthase and A(2756)G of methionine synthase, with lowered plasma homocysteine levels. *Atherosclerosis* 149 (2000), 131 – 137
95. Tucker K.L., Hannan M.T., Qiao N. et al. : Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: The Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 20 (2004); 152 – 158
96. Ubbrink J.B., Vermaak W.J.H., van der Merwe A., Becker P.J., Delpont R., Potgieter H.C.: Vitamin requirements for a treatment of hyperhomocysteinemia in humans. *J Nutr* 124 (1994), 1927-1933
97. van Beynum I.M. et al.: Hyperhomocysteinemia : a risk factor for ischemic stroke in children. *Circulation* 99 (1999), 2070 – 2072
98. Wald D.S., Law M., Morris J.K.: Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 325 (2002), 1202
99. Wu L.L., Hunt S.C., James B.C., Vincent G.M., Williams R.R., Hopkins P.N.: Plasma homocysteine as a risk factor for early familial coronary artery disease. *Clin Chem* 40/4 (1994), 552 – 561

8. Anhang

8.1 Ärztefragebogen

Anamnese- und Befunddokumentation

Patientenaufkleber oder Name: Vorname: Geburtsdatum:

Datum der Blutabnahme: □□.□□.2004

Jahr der Diagnosestellung „Osteoporose“ □□□□

	ja	nein
• Niedrigenergiefrakturen	0	0
• primäre Osteoporose	0	0
• sekundäre Osteoporose	0	0
- endokrin-metabolisch (Hyperthyreose, M. Cushing, Diabetes, Hypogonadismus, Hyperparathyreoidismus, Wachstumshormonmangel)	0	0
→ welche Erkrankung?		
- sekundär-entzündlich (RA, SLE, M.Bechterew)	0	0
→ welche Erkrankung?		
- iatrogen-medikamentös (Steroide, Heparine, Laxantien, Antikonvulsiva, Wachstumshormone)	0	0
→ welche Medikamente?		
	ja	nein
- gastro-intestinal (Laktoseintoleranz, Pankreasinsuffizienz, Malabsorption, Maldigestion)	0	0
→ welche Erkrankung?		
- renal (chronische Niereninsuffizienz, Hyperkalzurie, metabolische Azidose)	0	0
→ welche Erkrankung?		
- sonstige	0	0

Bekommt der Patient folgende Therapie oder hat er sie früher bekommen?

	jetzt	früher	nein
• Kalzium	0	0	0
• Vitamin D3 oder Metabolit	0	0	0
• Östrogene und Gestagenschutz	0	0	0
• Fluoride	0	0	0
• Kalzitinin in Kombination mit Kalzium	0	0	0
• Bisphosphonate	0	0	0
• NSAR, Analgetika	0	0	0
• TNF α -Blocker	0	0	0

Röntgenbefunde

	ja	nein
• präklinische Osteoporose		
- Rarefizierung der horizontalen Trabekel	0	0
- Betonung der vertikalen Trabekel	0	0
- Transparenzerhöhung der Wirbelkörper	0	0
- Hervortreten der Grund-/ Deckplatten	0	0
• Wirbelkörperfraktur		
- Höhenminderung des Wirbelkörpers um 20%	0	0
- Keilwirbel	0	0
- bikonkaver Fischwirbel	0	0
- Kompressionsfraktur	0	0

Osteodensitometrie

- Lendenwirbelsäule L1-L4
 - BMD
 - T-Score

- Total-Hip
 - BMD
 - T-Score

Laborbefunde

- Kollagen Crosslinks
 - vermindert 0
 - normal 0
 - erhöht 0
- Blutbild
 - Hb g/dl
 - Hk %
 - Leukozyten / μ l
 - Lymphozyten / μ l
 - Thrombozyten / μ l
- Blutsenkung mm/h
- CRP mg/l

Sind folgende Parameter erhöht, erniedrigt oder normal?

	erhöht	erniedrigt	normal
• Ca-Spiegel	0	0	0
• Phosphatspiegel	0	0	0
• Alkalische Phosphatase	0	0	0
• Osteokalzin	0	0	0
• Vitamin D	0	0	0
• 1,25 (OH) ₂ D ₃	0	0	0
• Proteinausscheidung im Urin	0	0	0
• Ca im 24h-Sammelurin	0	0	0
• Parathormon	0	0	0
• T3, T4	0	0	0

8.2 Patientenfragebogen

Aufklärung zur Homocysteinestudie bei Osteoporosepatienten

Sehr geehrte Patientin!

Sehr geehrter Patient!

Sie leiden an Osteoporose, einer Krankheit, die durch niedrige Knochenmasse und Zerstörung des Feinaufbaues des Knochengewebes gekennzeichnet ist.

Dies führt zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit und somit zu einem erhöhten Knochenbruchrisiko.

Zur Zeit wird in der Abteilung Rheumatologie und Osteologie eine Studie durchgeführt, in der das Homocystein als ein möglicher Risikofaktor für Osteoporose untersucht wird. Dieses Homocystein findet sich im Blutserum und ist bei Patienten mit Osteoporose offenbar erhöht.

Wir möchten hier Zusammenhänge erkennen und aufzeigen, um eventuell einen Fortschritt in Diagnostik und Therapie erreichen.

Außerdem werden wir Kollagenabbauprodukte (sogenannte Crosslinks), die vorrangig aus dem Knochen stammen, im Urin untersuchen, da diese bei „aktiver“ Osteoporose und einigen anderen Erkrankungen vermehrt ausgeschieden werden.

Wir möchten Sie daher bitten, an dieser Studie freiwillig teilzunehmen und den folgenden Fragebogen nach bestem Wissen sorgfältig zu beantworten.

Desweiteren benötigen wir eine Blutprobe, die im Rahmen der normalen Blutentnahme abgenommen wird und eine Urinprobe von Ihnen.

Alle Ihre Daten und Angaben aus dem Fragebogen werden selbstverständlich streng vertraulich behandelt und anonymisiert verarbeitet.

Wir hoffen, dass wir Ihnen mit den Ergebnissen dieser Studie auch weiterhelfen können und möchten uns sehr herzlich für Ihre Bereitschaft und Mitarbeit bedanken.

Auf Wunsch können wir Ihnen die entsprechenden Befunde auch zur Verfügung stellen.

Im Namen von Prof. Hein, OA Dr. Lehmann, Dr. Müller und den Mitarbeitern der Abteilung Rheumatologie und Osteologie,

Eva Honnes, geb. Otto
(Doktorandin)

Patientenfragebogen – Homocystein-Studie bei Osteoporosepatienten

Name:

Geburtsdatum: ..

Geschlecht: weiblich ☐

 männlich ☐

Körpergröße:cm

Körpergewicht:kg

- | | ja | nein |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| • Rauchen Sie? | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| - seit wann? | | |
| - wie viele Zigaretten täglich? | | |
| • Haben Sie früher geraucht? | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| - wie lange? | | |
| - wie viele Zigaretten täglich? | | |
| • Trinken Sie Alkohol? | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| - nie <input type="radio"/> | | |
| - selten <input type="radio"/> | | |
| - regelmäßig <input type="radio"/> | | |
| • Nehmen Sie Medikamente ein? | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| - wenn ja, welche? | | |
| | | |
| | | |
| • Welchen Beruf üben Sie aus? | | |
| | | |
| • Treiben Sie Sport? | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |

Leiden Sie an folgenden Erkrankungen oder haben Sie früher darunter gelitten?

	jetzt	früher	nein
• Schilddrüsen-Überfunktion	0	0	0
• Nebenschilddrüsen-Überfunktion	0	0	0
• Diabetes mellitus	0	0	0
• Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes	0	0	0
• Milchunverträglichkeiten	0	0	0
• Nierenerkrankungen	0	0	0
• Rheumatoide Arthritis	0	0	0
• Systemischer Lupus erythematodes	0	0	0
• Morbus Bechterew	0	0	0
• Hatten Sie einen bösartigen Tumor?	0	0	0

- falls ja, welchen?

.....

	ja	nein
• Mussten Sie in den letzten 3 Monaten länger als 3 Wochen Bettruhe einhalten?	0	0
• Mussten Sie im vergangenen Jahr länger als 6 Wochen Bettruhe einhalten?	0	0

Haben oder hatten Sie folgende Beschwerden?

	jetzt	früher	nein
• Frakturen (= Knochenbrüche)			
→ Wirbelkörper	0	0	0
→ Handgelenk	0	0	0
→ Oberschenkelhals	0	0	0
→ andere Brüche	0	0	0
• Körpergrößenabnahme	0	0	0
→ wie viel in etwa?cm			

• Nehmen Sie Vitamintabletten ein?	ja	0	nein	0
- Vitamin B12		0		0
- Vitamin B6		0		0
- Folsäure		0		0
- Multivitaminpräparate, die mindestens zwei der oben genannten Vitamine enthalten		0		0

Nur Patientinnen

- Haben Sie Kinder geboren? **ja** 0 **nein** 0
- In welchem Lebensjahr war ihre erste Menstruation?

Wann begann Ihre Menopause?

9. Lebenslauf

Eva-Christina Honnes, geb.Otto,
geboren am 18.10.1976 in Krefeld

08/1983 - 07/1987	Bischöfliche Maria Montessori Grundschule, Krefeld
09/1987 - 07/1996	Bischöfliche Maria Montessori Gesamtschule, Krefeld Abschluss Abitur
10/1996 - 09/1999	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
10/1999 - 04/2005	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
04/2005	Beginn des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum Essen
05/2006	Abschluss des Studiums mit dem 3.Staatsexamen
04/2005 - 08/2005	1. Tertial des Praktischen Jahres, Viszeralchirurgie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Essen
08/2005 - 11/2005	2. Tertial des Praktischen Jahres, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Essen
11/2005 - 03/2006	3. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Universitätsklinikum Essen
09/2006 – 06/2007	Praxisassistentin der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde bei Dr. med. M. Kamp, Kempen
seit 07/2007	Assistenzärztin der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Helios Klinikum Krefeld, HNO-Klinik, Direktor Prof. Dr. med. R. Leuwer

Krefeld, 07.09.2010

10. Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Herrn **Prof. Dr. med. G. Hein** für die freundliche Überlassung des Themas. Seine wertvollen Anregungen, Kritik und sein Engagement, mit dem er mir stets helfend zur Seite stand, vor allem aber seine Geduld, haben mir den Fortgang der Arbeit erleichtert.

Herrn **Dr. rer. nat. A. Müller** und Frau **A. Schubert** danke ich für die unersetzliche Hilfestellung während der Laborarbeiten.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Herrn **Dr. med. M. Busch** bedanken, der mir eine wichtige Hilfe bei der Auswertung der Chromatogramme war und darüber hinaus für Fragen jederzeit zur Verfügung stand.

Ich danke im Besonderen meinen Eltern und Schwestern Julia und Cordula, die mich mit ihrem nicht enden wollenden Optimismus und ihrer Unterstützung stets begleitet haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Ehemann S. Honnes bedanken, der zu jeder Zeit mit seiner Unterstützung, intensiven Gesprächen und seinem Verständnis meine Zweifel an einem Abschluss der Promotion zerstreut hat.

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass mir die geltende Promotionsordnung der medizinischen Fakultät bekannt ist.

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskriptes unterstützt:

Prof. Dr. med. G. Hein	(Auswahl des Materials und Korrekturen des Manuskriptes)
Dr. rer. nat. A. Müller	(Unterstützung bei Laborarbeiten)
Frau A. Schubert	(Unterstützung bei Laborarbeiten)
Dr. med. M. Busch	(Auswertung des Materials)

Ich erkläre, dass ich keine Hilfe eines Promotionsberaters oder eines anderen Dritten in Anspruch genommen habe.

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation, eine in wesentliche Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation nicht eingereicht habe.